

**CUANTIFICACIÓN DE CADMIO EN CACAO PROVENIENTE DEL OCCIDENTE
DE BOYACÁ POR LA TECNICA ANALITICA DE VOLTAMPEROMETRÍA**

**IVAN DARIO NIÑO BERNAL
200910783**

**PROYECTO DE GRADO PRESENTADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**



**UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA QUÍMICA DE ALIMENTOS
TUNJA
2015**

**CUANTIFICACIÓN DE CADMIO EN CACAO PROVENIENTE DEL OCCIDENTE
DE BOYACÁ POR LA TECNICA ANALITICA DE VOLTAMPEROMETRÍA**

**IVAN DARIO NIÑO BERNAL
200910783**

**PROYECTO DE GRADO PRESENTADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

MODALIDA DE INVESTIGACIÓN

**Director
PhD. OSWALDO ELIECER CÁRDENAS GONZALEZ**



UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA QUÍMICA DE ALIMENTOS

TUNJA

2015

Nota de aceptación:

Firma del director de tesis

Firma de jurado

Firma de jurado

Tunja 31 de julio de 2015

DEDICATORIA

Dedico este triunfo a mis padres Pedro José Niño Zambrano y Elizabeth Bernal Leaño quienes han sido mi apoyo incondicional, mi ejemplo de vida, por ser quienes me brindaron la oportunidad de ser mejor con el trasegar del tiempo, enseñándome el significado de la perseverancia a luchar y salir adelante sin importar las dificultades que se presentan en el día a día, por enseñarme a nunca desfallecer a hacer las cosas con amor y sobre todo a no decir no puedo.

A mis hermanos Jaime, Jairo, Oscar y Sonia quienes han sido parte fundamental en este proceso, por sus consejos, por sus amistades, por sus regaños y porque siempre demostraron que hay que caminar con la cabeza en alto y no desfallecer sin importar que tan duro sea el camino tomado.

A mi abuelo Julio Enrique Bernal y a mi tía Gloria Niño Zambrano quienes han sido mis segundos padres brindándome su amor, su apoyo; por ser un ejemplo a seguir, por siempre estar ahí en los momentos más difíciles por ser las personas maravillosas que son.

A Daisy mi novia quien es mi compañera de aventuras; amante de la danza, a ella por su compañía, por sus buenos consejos, por su paciencia, por su apoyo y sobre todo por brindarme su cariño y afecto.

Al profe Oscar Avellaneda quien me brindo su amistad y me acogió como un hijo, por ser tan buena persona, tan buen amigo, por ser el mejor de los consejeros y por enseñarme a no dejar a un lado ese amor por la cultura

A mis amigos Mary, Viviana, Gyna, Raúl, Darío, Erick (moe), Toño, Jonathan, Juan Carlos (polo), Kevin, diana (flaca) y Slendy; a todos ellos por brindarme esa amistad incondicional y por cada alegría compartida.

Al grupo de danzas Nemqueteba por acogerme durante toda mi carrera y permitirme conocer buenas personas, de mis mejores amigos Wilmar (chochochoa), Felipe (titiribi) y Andresito (el negrito).

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus profundos agradecimientos a:

El Ph.D. Oswaldo Cárdenas, por su amistad incondicional, que llena de amabilidad, cordialidad, conocimiento y experiencia nos han brindado la dirección y orientación para llevar a cabo este proyecto.

Los miembros del grupo QUIMOL, por el apoyo brindado en estos meses de trabajo.

Los jurados del proyecto Jairo Antonio Cubillos y Efren Muñoz Prieto; por su colaboración y sugerencias útiles para la realización de este proyecto.

Los profesores de la Escuela de Química de Alimentos, por impartir sus conocimientos y experiencias en estos años de estudio.

Darío Martín Gordo, por su orientación, colaboración e impartirme conocimiento

Mauricio Colmenares, por su apoyo, orientación y entrega; que fueron indispensables para culminar exitosamente esta investigación.

A José Montaña y a la empresa COINTEBOY de Otanche Boyacá por facilitarme el cacao para el análisis.

Los laboratoristas: María del Carmen Camargo, Michael Medina y John Jairo Vargas; por su colaboración al facilitarnos materiales y equipos para desarrollar de mi proyecto.

Cada uno de nuestros compañeros y amigos quienes durante el transcurso de estos años nos brindaron su amistad, apoyo y compañía, y con los cuales compartimos momentos extraordinarios que jamás se olvidarán.

Cada una de las personas que de una u otra manera contribuyeron al desarrollo de este proyecto.

Tabla de contenido

RESUMEN.....	12
1. INTRODUCCION	13
2. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL TRABAJO	14
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
2.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	15
2.3 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	15
2.4 JUSTIFICACIÓN	16
2.5 OBJETIVOS	17
2.5.1 Objetivo General.....	17
2.5.2 Objetivos específicos.....	17
3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DE ARTE.....	18
3.1 MARCO TEÓRICO	18
3.1.1 Cacao	18
3.1.2 Metales pesados (cadmio).....	19
3.1.3 Niveles máximos permisibles	21
3.1.4 Métodos de extracción de Cd en alimentos.....	21
3.1.5 Digestión ácida	22
3.1.6 Voltamperometría.....	22
3.1.7 Polarografía.....	26
3.1.8 Validación	32
3.1.9 Robustez.....	38
3.1.10 Análisis de varianza anova	38
3.2 ESTADO DEL ARTE	39
3.2.1 Cadmio en suelos y cultivos	40

3.2.2	Cadmio en ecosistemas acuáticos	42
3.2.3	Disponibilidad de cadmio en cacao	43
4.	MARCO LEGAL	44
4.1	Recomendaciones FAO/OMS	44
5.	MATERIALES Y METODOS	45
5.1	FASES DE LA INVESTIGACIÓN	45
5.1.1	Fase 0: revisión bibliográfica	45
5.1.2	Fase 1: Preparación de la muestra	45
5.1.3	Fase 2 preparación de la curva de calibración	45
5.1.4	Fase 3 Cuantificación de cadmio en el cacao	46
5.1.5	Métodos de análisis y tratamientos de datos e información	46
5.2	PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PATRÓN	46
5.2.1	Preparación de solución patrón de cadmio	46
5.2.2	Solución reguladora de pH Britton-Robinson (Electrolito Soporte)	46
5.2.3	Solución de trabajo para la adición del metal	47
5.3	TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	47
5.4	DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS GENERALES PARA LA EJECUCIÓN DE ANÁLISIS	47
5.4.1	Método de investigación	47
5.4.2	Población y muestra	48
5.4.3	Hipótesis	48
5.4.4	Diseño de experimentos	48
5.4.5	Variables para la cuantificación de cadmio	48
5.4.6	Análisis Estadístico	49
6.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	50
6.1	PARÁMETROS GENERALES DETERMINADOS PARA LA EJECUCIÓN DE LAS MEDIDAS	50

6.2	FACTORES A TENER EN CUENTA EN EL MOMENTO DE REALIZAR MEDIDAS MEDIANTE VOLTAMPEROMETRIA.....	51
6.2.1	Desoxigenación de la muestra.....	51
6.2.2	Rangos de potencial	51
6.3	PREVALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	51
6.3.1	Tratamiento de la muestra	51
6.3.2	Curva de calibración	52
6.3.3	Límites de detección y cuantificación.....	54
6.4	RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS.....	54
6.4.1	RESULTADOS PARA VOLTAMPEROMETRIA CON ELECTRODO DE CARBÓN VÍTREO Y VOLTAMPEROMETRIA CON ELECTRODO DE MERCURIO O POLAROGRAFIA	55
6.4.2	PARTICULARIDADES DEL MÉTODO	57
6.5	RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS	60
6.5.1	Análisis de varianza	62
7.	CONCLUSIONES.....	64
8.	RECOMENDACIONES	65
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
10.	ANEXOS.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Señal de potencial utilizado en voltamperometría de barrido lineal	23
Figura 2. Señal de potencial utilizado en voltamperometría de impulso diferencial	24
Figura 3. Señal de potencial utilizado en voltamperometría de onda cuadrada	24
Figura 4. Señal de potencial utilizado en voltamperometría cíclica (triangular)	24
Figura 5. Voltamperograma de barrido lineal de la reducción de una especie hipotética A para dar un producto P.....	25
Figura 6. Electrodo de gotas de mercurio (tomada de manual de instrucciones MF-9058 CGME)	26
Figura 7. Diagrama esquemático de una celda electrolítica (izquierda) y una galvánica (derecha).	28
Figura 8. Polarograma de (A) una disolución 1M de HCl que es $5 \cdot 10^{-4}$ M en Cd^{2+} y (B) una disolución 1M de HCl	30
Figura 9. Curva de calibrado para $[\text{FeSCN}^{2+}] \cdot 10^{-4}$ M.....	32
Figura 10. Método de adición de estándar.....	34
Figura 11. Límite de detección	36
Figura 12. Intervalo útil.....	37
Figura 13. Voltamperograma de las medidas de concentración para la curva de calibración con electrodo de carbón vítreo.	52
Figura 14. Voltamperograma de las medidas de concentración para la curva de calibración con electrodo de mercurio.	53
Figura 15. Curva de calibración para cadmio con electrodo de carbón vítreo	53
Figura 16. Curva de calibración para cadmio con electrodo de mercurio.....	54
Figura 17. Voltamperograma estándar bajo (400 ppb)	55
Figura 18. Voltamperograma estándar alto (900 ppb)	56
Figura 19. Gráfico de barras para muestra A	62
Figura 20. Diagrama de caja muestra A.....	62
Figura 21. Gráfico de barras para muestra B	63
Figura 22. Diagrama de cajas muestra B.....	63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propuestas de niveles máximos para el cadmio en el chocolate y productos derivados de cacao para observaciones	44
Tabla 2. Condiciones de trabajo para Voltamperometría de onda cuadrada.....	50
Tabla 3. Condiciones de trabajo para Voltamperometría diferencial de pulso de redisolución anódica	50
Tabla 4. Precisión para el estándar bajo.....	57
Tabla 5. Precisión para el estándar alto.....	57
Tabla 6. Precisión para muestra A con adicionado de estándar bajo (15 ppb)	58
Tabla 7. Precisión para muestra B con adicionado de estándar alto (150 ppb)	58
Tabla 8. Precisión para el estándar bajo.....	58
Tabla 9. Precisión para el estándar alto.....	58
Tabla 10. Precisión para muestra A con adicionado de estándar bajo (400 ppb).....	58
Tabla 11. Precisión para muestra B con adicionado de estándar alto (900 ppb)	59
Tabla 12. Porcentaje de recuperación para voltamperometría con electrodo de mercurio.	59
Tabla 13. Porcentaje de recuperación para voltamperometría con electrodo de carbón vítreo.	60
Tabla 14. Resultados de cuantificación para voltamperometría con electrodo de carbón vítreo	61
Tabla 15. Resultados de cuantificación para voltamperometría con electrodo de mercurio.	61
Tabla 16. Resultados de cuantificación obtenidos por espectroscopia de absorción atómica	61

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Inventario de equipos.....	70
Anexo 2. Inventario de reactivos y materiales	71
Anexo 3. Análisis estadístico anova de un factor para muestra A	71
Anexo 4. Análisis estadístico anova de un factor para muestra B	73
Anexo 5. Tablas de resultados de validación de métodos	74

RESUMEN

En este estudio se cuantificó el contenido de cadmio en cacao de dos especies la E.E.T.8 (estación experimental tenesis 8) y C.C.N.51 (colección castro naranjales 51), provenientes del occidente de Boyacá. Para el análisis respectivo se utilizó los métodos de voltamperometría con electrodo de mercurio y electrodo de carbón vítreo; debidamente validado y estandarizado, obteniendo los niveles de cadmio en la matriz de interés. Se realizó un comparativo con el método de absorción atómica para verificar la robustez de cada método e identificar cual método tiene un mejor nivel de confianza.

La validación de este método se realizó, definiendo parámetros de sensibilidad, selectividad, precisión, exactitud y linealidad, obteniendo resultados satisfactorios para voltamperometría con electrodo de mercurio en cada uno de los parámetros, mostrando que el método presenta un comportamiento lineal con un coeficiente R^2 superior al 0,95, una precisión (%RSD) inferior al 10%, mostrando que es selectivo a un rango de potencial de 0,40 a 0,70 V.

La cuantificación dio a conocer de igual manera que el método más confiable es voltamperometría con electrodo de mercurio, obteniéndose concentraciones entre 1535 y 1585 ppb para E.E.T.8 y entre 2848 y 2968 ppb para C.C.N.5, concentraciones que superaron los niveles máximos permisibles (1500 ppb para caco en polvo), establecido por la FAO/OMS en este tipo de alimentos.

1. INTRODUCCION

La contaminación por metales pesados ha generado actualmente problemas de forma masiva, provocados fundamentalmente por la actividad antrópogenica. Algunas especies vegetales desarrollaron mecanismos fisiológicos y bioquímicos, para minimizar los efectos de los metales pesados, controlando su absorción, acumulación y translocación en el tejido vegetal, recibiendo el nombre de plantas hiperacumuladoras. Estas plantas pueden ser hiperacumuladoras, pueden ser receptores pasivos de metales pesados, también pueden ejercer control sobre la translocación o reinserción de algunos elementos a través de reacciones fisiológicas específicas ^[1]

El cacao es una fuente importante de minerales como hierro, magnesio, zinc y fósforo; contiene hidratos de carbono y grasas constituyéndolo fuente importante de energía para el ser humano. La hiperacumulación de metales pesados en esta planta es el principal factor influyente en la salud humana debido a que el Cd produce nefrotoxicidad severa. La exposición al Cd también ha sido asociada con el desarrollo de osteoporosis, de igual manera se ha coligado la exposición a Cd con una alta mortalidad por cáncer. ^[2]

La determinación de Cd para el análisis cuantitativo o cualitativo se puede llevar a cabo mediante métodos instrumentales como voltamperometría u espectroscopia. Debido a la presencia de Cd en el fruto de cacao, se requiere que la sensibilidad del equipo u instrumento a usar sea el adecuado (ppb). Por consiguiente en esta investigación se realizará dicho análisis mediante voltamperometría; se conoce que mediante polarografía con electrodo de mercurio se tiene información cuantitativa en productos derivados del cacao (chocolate de mesa), encontrando la presencia de dicho metal en un rango superior a 100 ppb y menor a 750 ppb, por esta razón es indispensable analizar el fruto de la planta de cacao y mediante datos mostrar si dicho metal (Cd) está en el fruto o es adquirido en algún proceso de elaboración de productos derivados del cacao.

La finalidad de esta investigación es cuantificar el Cd presente en el fruto del cacao ***Theobroma cacao L***, utilizando voltamperometría, con el fin de conocer la concentración de este metal en el cacao poscosecha.

2. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL TRABAJO

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los cultivos tropicales de mayor importancia, tanto en el ámbito nacional como internacional. En Colombia, intervienen de forma directa en su explotación más de 25 mil familias, de las cuales el 90% desarrolla su proceso productivo en condiciones de economía campesina. En el 2008, al norte de la cordillera oriental hubo participación en la producción nacional con el 50%, equivalente a 19 mil toneladas de grano. La mayor parte de la producción actual del país la consume la industria de chocolate, como materia prima y en sus procesos se generan gran cantidad de empleos, al igual que para la comercialización de los productos elaborados. El chocolate de mesa producido por la industria nacional, se destaca como un componente importante de la canasta familiar colombiana; también otros productos de confitería que originan divisas para el país a través de la exportación. El cacao es una especie primordial en el sistema agroforestal campesino, es considerada una planta reforestadora porque convive en equilibrio con una amplia diversidad de flora y fauna. En general, la planta de cacao se caracteriza por su amigabilidad con el medio ambiente, razón por la cual es necesario conservar. ^[3]

En la actualidad se está investigando la relación existente entre los metales pesados y productos de alta comercialización como es el cacao. En recientes investigaciones, se encontró la presencia de cadmio en cacao y productos derivados de este, debido a los antecedentes de este metal podemos concluir que el alimento no genera inocuidad; generando deficiencias en el funcionamiento metabólico del cuerpo humano con altos riesgos a la salud

2.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Es posible cuantificar el contenido de cadmio en el cacao procedente del occidente de Boyacá por la técnica analítica de voltamperometría con electrodo de mercurio y de carbón vítreo?

2.3 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Se realizará el análisis en cacao proveniente del occidente de Boyacá y mediante la técnica analítica voltamperometría.

2.4 JUSTIFICACIÓN

En el departamento de Boyacá no existen estudios específicos que evalúen de forma cuantitativa el nivel de cadmio en la producción de cacao, con voltamperometría; si bien es de vital importancia determinar el contenido de cadmio presente en este alimento, ya que este metal repercute en la salud humana y en el medio ambiente, clasificándose como toxicológico y ecotoxicológico. Por este motivo, se hace necesaria la realización de estudios que aporten datos preliminares acerca de las concentraciones de cadmio, resultados que influirán directa o indirectamente en el sector productivo del departamento.

Con este trabajo se cuantificará el valor de cadmio presente en el cacao mediante técnicas instrumentales específicamente por voltamperometría, ya que esta técnica es viable por sus niveles de sensibilidad, confiriéndonos mejores resultados y aportando datos recientes de la concentración de Cd en cacao.

Siendo el cacao un cultivo de gran relevancia económica, social y ambiental para Colombia y constituyéndose en una especie primordial del sistema agroforestal campesino de muchas regiones, es necesario desarrollar investigaciones para generar aportes sobre las características de este fruto y tener así un mejor control en la producción

2.5 OBJETIVOS

2.5.1 Objetivo General

Cuantificar el contenido de cadmio por voltamperometría presente en el fruto del cacao *Theobroma cacao L.*

2.5.2 Objetivos específicos

- Estandarizar y validar los métodos para cuantificar el cadmio por voltamperometría.
- Optimizar el método para obtención de la matriz a partir de las muestras obtenidas del fruto de cacao.
- Cuantificar en la matriz de cacao (*T. cacao L.*), la concentración de cadmio presente en el fruto.

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DE ARTE

3.1 MARCO TEÓRICO

3.1.1 Cacao ^[3]

El cacao es de gran relevancia económica, social y ambiental. En Colombia es constituido en la industria como materia prima para la producción confitera en la industria chocolatera. En nuestro país la producción cacaotera en su mayoría es destinada para la producción de chocolates, logrando productos de calidad y exquisitos sabores, ya que sus propiedades organolépticas hacen que sea catalogado como un producto fino y de agradable aroma.

El cacao se encuentra dentro de los principales artículos básicos de los países productores y consumidores, por tanto las probabilidades de consumo de cadmio en alimentos provenientes del cacao son altas. Debido a su demanda en el mercado este metal tiene un período de semidesintegración biológica sumamente larga en los seres humanos y se acumula en los tejidos del organismo, en particular en el hígado y los riñones ^[2]. El cadmio es nefrotóxico y puede producir disfunciones en los tubos renales, que se caracterizan por un aumento de la excreción de proteínas. Cuando está presente en el suelo este puede ser extremadamente peligroso, y la toma a través de la comida puede incrementar ^[4].

3.1.1.1 Hábitat

Crece en topografía plana u ondulada. Llega a crecer en terrenos que sobrepasan el 50 % de pendiente, en cañadas, a orilla de arroyos. Exige temperaturas medias anuales elevadas con fluctuaciones pequeñas, una gran humedad y una cubierta que le proteja de la insolación directa y de la evaporación. La precipitación debe ser de 1,300 a 2,800 mm por año con una estación seca corta, menor de 2 meses y medio. El clima debe ser constantemente húmedo, con temperatura media diaria entre 20 y 30 °C, con una mínima de 16 °C. Para su pleno desarrollo exige suelos profundos (1 m como mínimo), fértiles y bien drenados. Deben evitarse suelos arcillosos, arenosos, mal drenado o muy superficial con presencia de rocas y un nivel freático poco profundo. Suelos: negro rocoso, café-rojizo barroso, aluvial.

3.1.1.2 Semilla

Almacenamiento / Conservación: Se han investigado métodos de almacenamiento para mantener las semillas viables fuera de la mazorca. La mejor respuesta de almacenamiento registrada es: 24 % de viabilidad después de 8 meses almacenando las semillas a 20 °C y 98 % de humedad relativa (40.6 % de contenido de humedad) en la presencia de un fungicida. Bajo estas mismas condiciones a los 2 meses se tiene una viabilidad de 77 % y un contenido de humedad de 41.4 %. La pérdida de viabilidad ocurrida durante los 8 meses de almacenamiento es inaceptable si se piensa en términos de conservación genética. Existen bancos de genes *ex situ* en forma de plantaciones de árboles de todas las variedades provenientes de semillas o multiplicados vegetativamente (clones). Existen unas 10 colecciones de germoplasma para el cacao (África, Brasil, Costa Rica, Ecuador, Puerto Rico, Florida, Costa de Marfil, Ecuador y Malasia), entre las que sobresalen por su número de clones son las siguientes: Cocoa Research Institute, en Tafo, Ghana, con 6,000 clones e International Cocoa Genebank, en Trinidad, con 1,872.

3.1.2 Metales pesados (cadmio).

3.1.2.1 Cadmio

Los metales son componentes naturales de la corteza terrestre. Tienen un papel importante en los organismos al ser parte fundamental de sus funciones bioquímicas y fisiológicas. Algunos son oligoelementos imprescindibles para el mantenimiento de los sistemas bioquímicos de los seres vivos, como por ejemplo, el cobre, el manganeso o el zinc, que son esenciales en el metabolismo de los mamíferos. Pueden actuar también como potentes tóxicos, tanto para los seres humanos como para los ecosistemas, según cuáles sean sus vías de exposición, la dosis absorbida y la naturaleza química del metal, la mayoría de los metales de fuentes naturales suelen provenir de la corteza terrestre.

Los metales pesados constituyen un riesgo considerable para la salud, por la ingesta involuntaria, contacto laboral y ambiental. La Agencia Estadounidense para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades, cataloga los riesgos de los desechos tóxicos de acuerdo con su prevalencia y la gravedad de la intoxicación

que originan. Entre los más peligrosos se encuentran el plomo, el mercurio, el arsénico y el cadmio; donde este último ocupa el lugar número 6, razón por la cual es de gran interés cuantificarlo. La comida y los cigarrillos son las principales fuentes de exposición al cadmio en la población general. Esta exposición también puede darse a través de líquidos, ya sea por las cañerías que contienen cadmio en sus soldaduras o por el agua que ha sido contaminada por las fábricas que arrojan sus desechos al río; de igual manera por la explotación minera. Se ha calculado que más de 80% del cadmio ingerido proviene de cereales (especialmente arroz y trigo), verduras (de hoja) y tubérculos (principalmente papas y zanahorias). El cadmio se almacena principalmente en el hígado y los riñones; la excreción es lenta, con una media de vida muy larga (décadas) en el cuerpo humano; se acumula en la mayor parte de los tejidos durante el envejecimiento.^[5]

El cadmio es un elemento divalente, con un peso atómico de 48, masa atómica de 112,41, punto de fusión 320,9 °C y punto de ebullición de 767 °C. Es fácilmente soluble en ácidos minerales, con los que forma las sales correspondientes y es insoluble en agua, aunque sus sales de cloro y sulfato sí lo son. La incorporación natural de cadmio procede, principalmente, de la actividad volcánica, lixiviación de rocas e incendios forestales. Las fuentes antropogénicas de cadmio varían desde productos de la extracción de zinc, combustión de carbón, escoria de las minas, material catódico de baterías, producción de hierro y acero, fertilizantes y pesticidas.^[10]

Las propiedades físicas de este metal son: color blanco brillante, dúctil, maleable y resistente a la corrosión. Su densidad es de 8.642 g/cm³, y sus vapores son 3.88 veces más pesados que el aire. Su presión de vapor es relativamente alta, por lo que pasa fácilmente al estado de vapor y en este estado se oxida rápidamente produciendo óxido de cadmio que permanece en el aire. Cuando en la atmósfera hay gases o vapores reactivos, como los bióxidos de azufre o de carbono, reaccionan con ellos y produce respectivamente carbonato, sulfito, hidróxido, sulfato y cloruro de cadmio.

El cadmio está presente en la naturaleza como óxidos complejos. Los usos principales del cadmio refinado son: en baterías (pilas Ni Cd), pigmentos para plásticos, cerámica y esmaltes; estabilizadores para plásticos, placas de hierro y acero, también como elemento de aleación de plomo, cobre y estaño.

Uno de los mayores agentes tóxicos asociado a contaminación ambiental e industrial es el cadmio, pues reúne cuatro de las características más temidas de un tóxico:

1. Efectos adversos para el hombre y el medio ambiente.
2. Bioacumulación.
3. Persistencia en el medio ambiente.
4. “Viaja” grandes distancias con el viento y en los cursos de agua. [31]

3.1.3 Niveles máximos permisibles [6]

La FAO/OMS presenta datos estimados sobre la ingestión alimentaria de cadmio en muchos países de todo el mundo. En las estimaciones se utilizan métodos diferentes, que se indican en los documentos originales. Los niveles máximos de cadmio para cacao en polvo vendido al consumidor final o como ingredientes en cacao en polvo edulcorado vendido al consumidor final (para tomar), es de 1,5 ppm. Estas cifras, que documentan la declaración relativa al pequeño margen de seguridad entre la exposición derivada de una alimentación normal y la exposición que produce efectos nocivos, confirman el acierto de tomar medidas para reducir la exposición al cadmio derivada de la alimentación, no sólo para el consumidor medio sino también, con mayor razón, para quienes están especialmente expuestos a causa de la contaminación local o de determinados hábitos alimentarios

3.1.4 Métodos de extracción de Cd en alimentos

El método de extracción más usado para iones como Cd^{2+} en alimentos es la digestión ácida, en donde se eliminan interferencias como especies orgánicas y material particulado; de igual manera permite liberar el metal de interés de la matriz, manteniéndolo en solución, y facilitando su lectura por parte del método instrumental empleado.

3.1.5 Digestión ácida ^[30]

La digestión con ácido nítrico es adecuada para la extracción de diversos metales dentro de los cuales se encuentra el cadmio. La formación de nitrato de cadmio proporciona una buena matriz para la determinación del metal, sin embargo algunas muestras necesitan la adición de otros ácidos como ácido clorhídrico. Esta reacción produce clorato de cadmio, encargado de desplazar al nitrato y ácido sulfúrico que genera sulfato de cadmio. De esta manera se obtiene un compuesto más estable, logrando una digestión completa.

Igualmente es necesario emplear en el filtrado el ácido clorhídrico para lavar por su óptima acción solvente y garantizando una filtración completa sin residuos. Adicionalmente el lavado con agua caliente es necesaria con el fin de aumentar la solubilidad del ácido.

3.1.6 Voltamperometría ^{[7] [36] [39]}

La voltamperometría comprende un grupo de técnicas electroquímicas que se basan en la respuesta corriente-potencial de un electrodo polarizable en la solución que se analiza. Los métodos voltamperométricos incluyen un conjunto de métodos electro-analíticos en los que la información sobre el analito se obtiene a partir de medidas de la intensidad de corriente en función del potencial aplicado al electrodo indicador o de trabajo.

Las medidas voltamperométricas implican un consumo mínimo de especie electro-activa (tiene lugar una micro-electrolisis) y pueden enfocarse desde dos puntos de vista:

- Determinación de la concentración de la especie electro-activa a partir de la medida de la intensidad de corriente. Esta técnica utiliza normalmente un electrodo indicador de gotas de mercurio, denominándose **polarografía**.
- Determinación del punto final de una valoración por medida de la intensidad de corriente en función de la cantidad de reactivo valorante. Este el caso de las **valoraciones amperométricas**, que pueden ser volumétricas o coulombimétricas.

Históricamente, la voltametría se desarrolló del descubrimiento de la polarografía por el químico checoslovaco Jaroslav Heyrovsky en 1922. Más adelante Matherson y Nichols desarrollaron los métodos de barrido rápido de potencial, técnicas (voltametría de barrido lineal y cíclica) que fueron descritas teóricamente por Randles y Sevcik; este avance constituye un paso importante en la evolución de estos métodos electroanalíticos. Actualmente, se han desarrollado numerosas técnicas voltamétricas de alta sensibilidad, que tiene cada día mayor campo de aplicación en las diversas áreas de la ciencia y la tecnología.

3.1.6.1 Señales de excitación en voltamperometría

En voltamperometría, se aplica a una celda electroquímica, que contiene un microelectrodo, una señal de excitación que es un potencial variable. Esta señal de excitación provoca una respuesta de intensidad de corriente característica en la que se basa el método.

La señal de excitación clásica de voltamperometría es el barrido lineal que se muestra en la figura 1, en la que el potencial de corriente se continúa aplicando a la celda, aumentando continuamente (normalmente en intervalo de 2 a 3 V) en función del tiempo. La intensidad de la corriente que se desarrolla en la celda se registra en función del tiempo (y, por tanto, en función del potencial aplicado).

Figura 1. Señal de potencial utilizado en voltamperometría de barrido lineal ^[7]

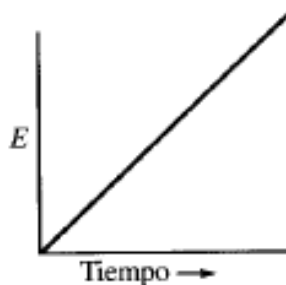


Figura 2. Señal de potencial utilizado en voltamperometría de impulso diferencial ^[7]

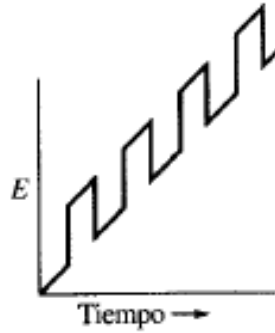
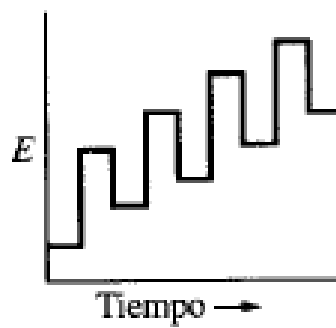
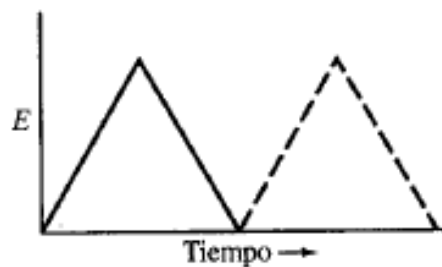


Figura 3. Señal de potencial utilizado en voltamperometría de onda cuadrada ^[7]



En la Figura 2 y 3 se muestran dos señales de excitación de impulsos. Las intensidades de corrientes se miden en diferentes momentos durante la vida de estos impulsos.

Figura 4. Señal de potencial utilizado en voltamperometría cíclica (triangular) ^[7]



La figura 4 muestran la onda de forma triangular en donde, el potencial varia de forma cíclicas entre dos valores, primero aumenta linealmente hasta un máximo y después disminuye linealmente con una pendiente del mismo valor numérico hasta su valor original. Este proceso se puede repetir numerosas veces, registrándose la intensidad de corriente en función del tiempo. Un ciclo completo puede durar hasta 100 segundos o más, o completarse en menos de un segundo.

3.1.6.2 Voltamperogramas

Se ilustra la apariencia de un voltamperograma de barrido lineal típico para una electrolisis que implica la reducción de una especie del analito A para dar un producto P (figura 5), en un microelectrodo de película de mercurio. En este caso, se supone que el microelectrodo está conectado al polo negativo de un generador de barrido lineal por lo que los potenciales aplicados se dan con signo negativo tal como se muestra. Las intensidades de corriente catódicas se tratan siempre como positivas, mientras que las corrientes anódicas se dan con un signo negativo.

Los voltamperogramas de barrido lineal adquieren generalmente la forma de una curva sigmoidea llamada onda voltamperométrica. La intensidad de corriente constante que aparece después de la pendiente se llama corriente límite debido a que se alcanza al ser limitada la velocidad a la cual el reactivo puede llegar a la superficie del electrodo por un proceso de transporte de masa. Las corrientes límites son, generalmente, directamente proporcionales a la concentración de reactante.

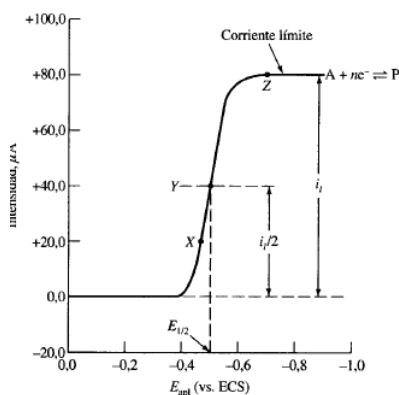


Figura 5. Voltamperograma de barrido lineal de la reducción de una especie hipotética A para dar un producto P. [7]

3.1.7 Polarografía

La determinación de la concentración de analito por medida de la intensidad de la corriente de electrólisis utilizando electrodos sólidos, como por ejemplo, platino, carbón vítreo, presenta una serie de dificultades asociadas con la no reproducibilidad de las respuestas del electrodo por depósitos producidos sobre su superficie y otros factores. La solución a muchos de estos problemas se consigue utilizando como indicador un electrodo de gotas de mercurio (EGM*), introducido por Heyrovsky en 1922 y que dio origen a la técnica conocida como polarografía.

3.1.7.1 Características del electrodo EGM

El electrodo de gotas de mercurio consiste en un capilar de vidrio (de 0.06-0.08 mm de diámetro interno y entre 10 y 15 cm de longitud) conectado mediante un tubo de teflón a un depósito conteniendo mercurio (figura 6). Las gotas de mercurio formadas en el extremo del capilar caen a velocidad constante, actuando cada gota de electrodo indicador.

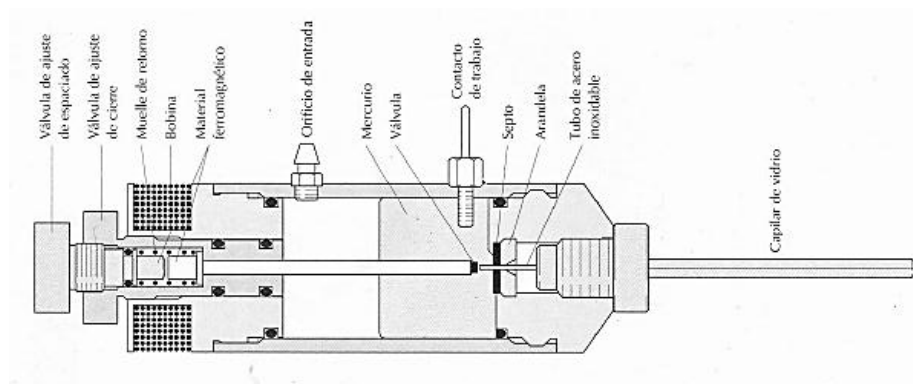


Figura 6. Electrodo de gotas de mercurio (tomada de manual de instrucciones MF-9058 CGME)

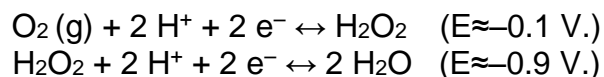
La utilización de este electrodo presenta ventajas e inconvenientes, que se relacionan seguidamente:

Las principales ventajas del electrodo de gotas de mercurio son:

- ✓ Las curvas intensidad-potencial obtenidas con el EGM son muy reproducibles, ya que el área del electrodo se renueva continuamente (con lo que no hay riesgo de contaminación) y se puede controlar perfectamente regulando la altura del depósito de mercurio. Como es un movimiento periódico, cualquier perturbación es momentánea: puede producirse en una gota, pero no en la siguiente.
- ✓ El EGM presenta un elevado sobre-tensión para la reducción de los iones H^+ , lo cual amplía considerablemente el campo para efectuar reducciones en medio ácido. Así, mientras que sobre platino, los iones H^+ se reducen aproximadamente a un potencial de 0 V., sobre mercurio puede llegarse hasta potenciales inferiores a -1.1 V. Esto posibilita la reducción de una gran cantidad de especies en medio ácido, cosa que no sería posible con un electrodo sólido.
- ✓ El pequeño tamaño del EGM permite el análisis de volúmenes muy pequeños; si es necesario, incluso de 1 ml.

En cuanto a los inconvenientes, cabe citar:

- ✓ La oxidación del mercurio tiene lugar a potenciales ligeramente superiores a 0 V, lo cual limita el uso del electrodo como ánodo.
- ✓ Una dificultad inherente al análisis voltamperométrico (y no atribuible exclusivamente al EGM) es la interferencia del oxígeno disuelto, debido a que produce dos ondas de reducción correspondientes a los procesos:



Por este motivo, es necesario eliminar el oxígeno disuelto cuando se van a efectuar reducciones en ese margen de potenciales.

3.1.7.2 Celdas electroquímicas [39]

Experimentalmente se trabaja con una colección de interfaces llamada celda electroquímica, que de manera general se define como dos electrodos separados por al menos una fase electrolítica.

Así, la reacción de Cd^0 con Cu^{2+} se puede esquematizar de la siguiente manera:



La línea vertical representa una interface sea líquido – líquido, sólido – sólido o sólido – líquido; la doble línea vertical indica una barrera denotada por un puente salino que cierra el circuito eléctrico sin que se pongan en contacto ambas soluciones. Algunas membranas selectivas y materiales especiales como el vidrio poroso pueden actuar como agentes separadores de semiceldas electroquímicas. Para indicar que dos o más componentes se encuentran en la misma fase se utiliza una coma como separador entre ellos. Algunos aspectos como la concentración, el disolvente en el que se encuentran inmersos, el estado de agregación de los componentes o la presión de los gases suele indicarse en esta notación.

Las celdas electroquímicas redox en las que interviene una corriente de electrólisis se pueden clasificar como galvánicas o electrolíticas como se ilustra en la Figura 7

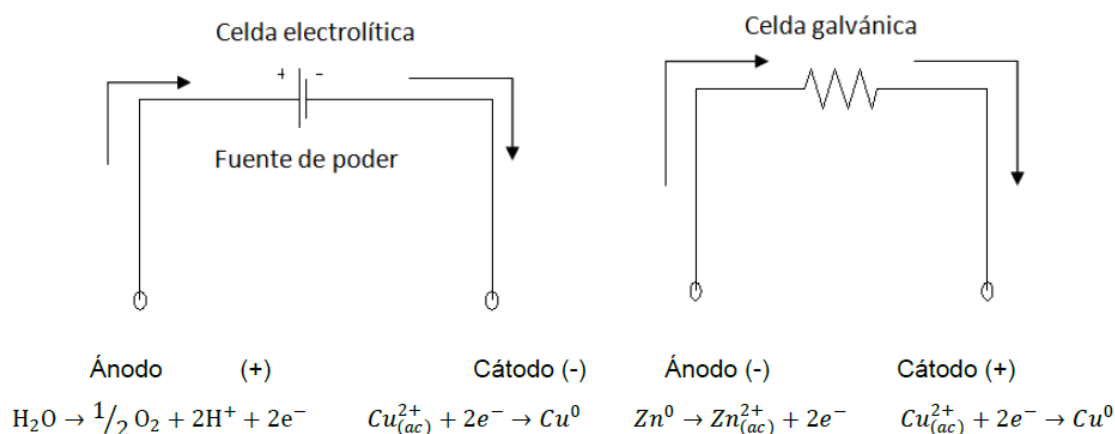


Figura 7. Diagrama esquemático de una celda electrolítica (izquierda) y una galvánica (derecha). [7]

En una celda galvánica la reacción electroquímica acontece de manera espontánea y la energía química se transforma en energía eléctrica.

En una celda electrolítica la reacción electroquímica se lleva a cabo por la imposición externa de un voltaje mayor al del potencial reversible de celda. También es posible la imposición de una corriente de electrólisis que permita la transformación electroquímica de los analitos en el medio.

En ambas celdas, el electrodo en el que ocurre la reducción se llama cátodo; mientras que el electrodo en el que ocurre la oxidación se llama ánodo. Por tanto, para que se lleve a cabo la reacción electroquímica se debe provocar una perturbación de carácter eléctrico y como consecuencia se obtiene una respuesta de tipo eléctrico, de donde se obtiene información del compuesto analizado y los procesos de reacción en la interface *conductor sólido – disolución* que acompañan a la reacción.

3.1.7.3 Polarogramas

La curva intensidad-potencial obtenida con un electrodo de trabajo de gotas de mercurio se denomina polarograma. Normalmente se utiliza un montaje con tres electrodos. Se mide la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el de referencia con un voltímetro de alta resistencia interna, de modo que por ese circuito apenas circula corriente. De esa forma, el potencial medido es el correspondiente al electrodo indicador (ΔE). En el electrodo auxiliar ocurre electrólisis, y puede ser, en principio, de cualquier material y forma. Como los dos circuitos tienen una porción común, para hacer despreciable la caída óhmica suele colocarse el electrodo de referencia próximo al indicador. La figura 8 muestra dos polarogramas, uno correspondiente a una disolución de 1,0 M en ácido clorhídrico y $5 \cdot 10^{-4}$ M en ion cadmio (curva A), y el otro correspondiente al ácido en ausencia de ion cadmio (curva B). La onda polarográfica en la curva A proviene de la reacción



Donde Cd (Hg) representa el cadmio elemental disuelto en mercurio, dando una amalgama. El aumento brusco de la corriente a aproximadamente -1V en ambos polarogramas es debido a la reducción de los iones hidrógeno dando hidrógeno molecular. El examen del polarograma correspondiente al electrolito soporte sólo

revela que una intensidad de corriente pequeña, llamada corriente residual, está presente en la celda incluso en ausencia de iones cadmio. Las corrientes límite se observan cuando la magnitud de la intensidad de corriente está limitada por la velocidad a la que el analito puede llegar a la superficie del electrodo.

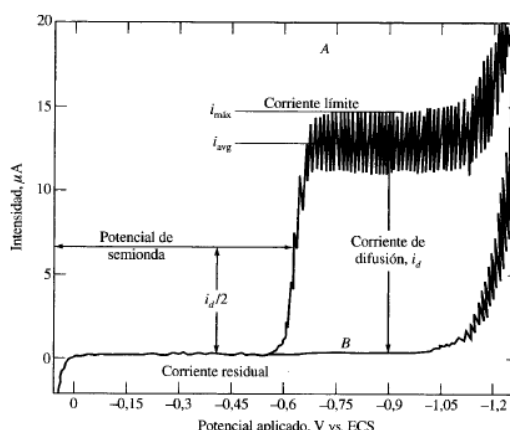


Figura 8. Polarograma de (A) una disolución 1M de HCl que es $5 \cdot 10^{-4}$ M en Cd^{2+} y (B) una disolución 1M de HCl

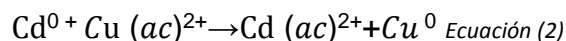
En polarografía, sin embargo, el único mecanismo de transporte de masa es la difusión y, por esta razón, las corrientes límite polarográficas se llaman normalmente corrientes de difusión.

3.1.7.4 Reacciones óxido – reducción

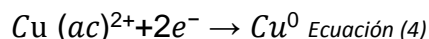
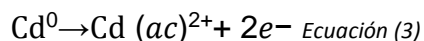
Una reacción de óxido-reducción se puede dividir en dos partes o semirreacciones: una en la cual la especie reactiva se oxida, y otra en la cual la especie reactiva se reduce. En general, el potencial de reducción, E , es característico del electrodo y la semirreacción redox correspondiente. La semirreacción se escribe, por convenio, en el sentido de reducción para definir el potencial (1):



Se tiene el siguiente caso (2):



En donde el Cd^0 se oxida y el Cu^{2+} se reduce de acuerdo a las siguientes semirreacciones (3,4):



El desplazamiento neto del equilibrio dependerá de la posición relativa de los pK_r de los pares redox involucrados y la imposición o no, de un estímulo externo. Se hablará de un sistema homogéneo cuando las especies reactivas se encuentran en la misma fase. En electroquímica se manejan sistemas heterogéneos donde la primera fase puede estar constituida por un electrolito, como una solución líquida, una sal fundida o bien, un líquido iónico. La segunda fase puede ser otro electrolito, un conductor sólido o bien una membrana semipermeable. Los conductores pueden ser metales o bien, semiconductores y el analito, la especie química en estudio, puede estar presente tanto en la solución líquida, en la sal fundida o formar parte de los conductores o las membranas semipermeables.

El potencial de reducción depende de las actividades de reactivos, a_x , y productos a_y , así como de la temperatura, tal y como lo expresa la **ecuación de Nerst (5)**:

$$E = E_0 - \frac{RT}{nF} \ln \left[\frac{(a_y)^b}{(a_x)^a} \right] \text{ Ecuación (5)}$$

En condiciones estándar de reactivos y productos ($a_x = a_y = 1$), o cuando $(a_x)^a = (a_y)^b$, el potencial de electrodo es igual al potencial estándar: $E = E_0$.

La polarografía es un método cualitativo; en una onda o curva polarográfica, se define el potencial de semionda, $E_{1/2}$ que es el potencial al cual la intensidad de difusión es la mitad que la intensidad límite y que es característico para cada especie en un medio dado. Es independiente de la concentración y de la característica instrumental, y presenta un valor muy próximo al potencial normal actual en el medio considerado.

La relación entre la concentración del analito, C_a y la corriente máxima se expresa mediante la **ecuación de Ilkovic (6,7)**:

$$(i_{lim})_{max} = 760 n D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} C_a \text{ Ecuación (6)}$$

$$(i_{lim})_{med} = 607 D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} C_a \text{ Ecuación (7)}$$

Donde n es el número de electrones transferidos en la reacción redox, D es el coeficiente de difusión del analito (constante de difusión de cm^2/seg), m es la velocidad de flujo de Hg (caudal de Hg en mL/seg), t es el tiempo de formación de la gota (seg). El potencial semionda, $E_{1/2}$ proporciona información cualitativa sobre la reacción redox.

3.1.8 Validación [32]

La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método voltamperométrico es adecuado para los fines previstos

3.1.8.1 Curvas de calibrado

La utilización de curvas de calibrado obtenidas a partir de series de patrones es, posiblemente, el método más utilizado en validación. Consiste en medir la propiedad analítica de interés, P_1 , P_2 , P_3 , etc. en una serie de muestras de composición conocida, C_1 , C_2 , C_3 , etc. y preparadas todas ellas en las mismas condiciones

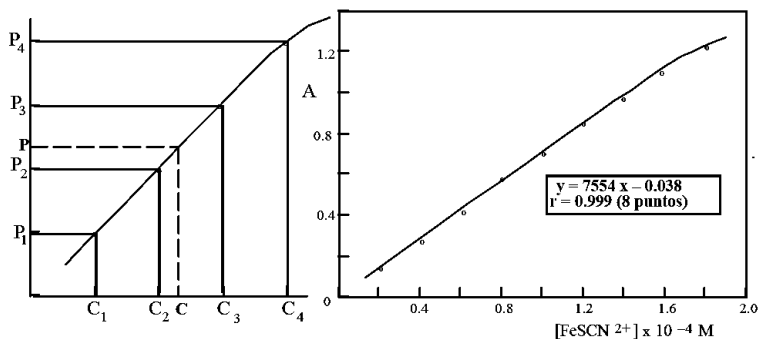


Figura 9. Curva de calibrado para $[\text{FeSCN}^{2+}] \cdot 10^{-4} \text{ M}$ [7]

El calibrado obtenido se emplea para determinar la cantidad o concentración en una muestra desconocida midiendo la magnitud de P en idénticas condiciones que los patrones y obteniendo C por interpolación.

La curva de calibrado se representa siempre con la respuesta del instrumento en el eje vertical (y) y las concentraciones sobre el eje horizontal (x).

El valor de C se puede acotar teniendo en cuenta la precisión de las medidas para las diversas concentraciones, y a tal fin existen métodos estadísticos adecuados.

Generalmente se utilizan calibrados en los que existe una relación lineal entre la señal analítica (y) y la concentración (x), tomando precauciones experimentales para asegurar que la linealidad de la respuesta se conserve en un amplio margen de concentraciones. En estos casos la forma de proceder consiste en obtener la **recta de regresión** de y sobre x (esto es, la "mejor" línea recta a través de los puntos de la gráfica de calibración, y que puede obtenerse, por ejemplo, por el método de mínimos cuadrados) y utilizarla para estimar la concentración de muestras problema por interpolación, así como también para estimar el límite de detección del procedimiento analítico. En la figura 9. Se muestra la ecuación de la recta de regresión de los primeros 8 puntos del calibrado que relaciona la absorbancia con la concentración de FeSCN^{2+} , así como el **coeficiente de correlación, r** (parámetro que se utiliza para estimar el grado de ajuste de los puntos experimentales a la recta).

3.1.8.2 Método de las adiciones estándar

El método consiste en añadir sobre una serie de alícuotas, cantidades conocidas del componente a determinar, y medir la magnitud de la propiedad analítica de interés tras las diferentes adiciones.

Para llevar a la práctica el método, usualmente se toman volúmenes iguales de disolución problema, y se añaden cantidades conocidas y diferentes de analito a todas las muestras, excepto a una, diluyendo, finalmente, todas al mismo volumen. Seguidamente se obtienen las señales instrumentales para todas esas disoluciones, y los resultados se representan como en la figura 10. La señal medida se representa en el eje y , mientras que en el eje x , la escala se expresa en términos de las cantidades de analito añadidas, ya sea como masa o como concentración.

El método se utiliza mucho en absorción atómica, así como en emisión y en algunas técnicas electroanalíticas. Resulta especialmente útil para los casos en los que la composición variable de las muestras desconocidas hace difícil la preparación de

patrones con la misma matriz de las muestras. De alguna forma, todas las medidas se realizan sobre la propia muestra.

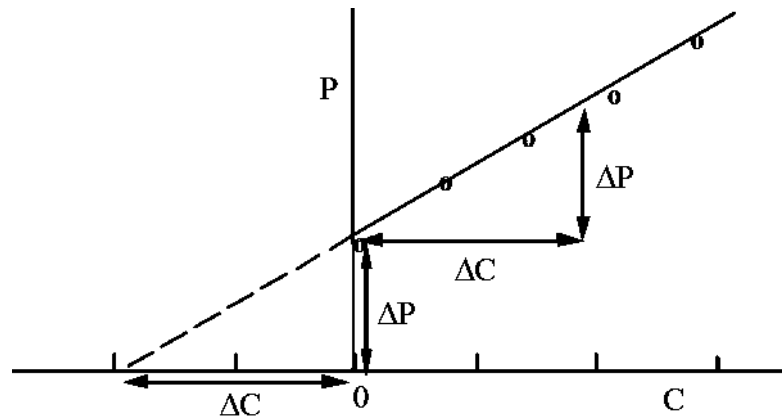


Figura 10. Método de adición de estándar

3.1.8.3 Exactitud

La exactitud mide el error sistemático o determinado de un método analítico. Se puede determinar por comparación con muestras patrón y por comparación con un método patrón. La exactitud normalmente se expresa en términos de porcentaje de recuperación mediante la siguiente fórmula:

$$\%R = \left(\frac{C_f - C_i}{C_a} \right) * 100 \quad \text{Ecuación (11)}$$

Donde C_f es la concentración de muestra junto con el estándar adicionado, C_i es la concentración de muestra sin adición de estándar y C_a es la concentración de estándar que se adiciona

3.1.8.4 Precisión

La precisión de un conjunto de mediciones está íntimamente relacionada con la presencia de errores indeterminados (o aleatorios) y se considera como una medida de la reproducibilidad de los resultados. Para describir la precisión se utiliza fundamentalmente la desviación estándar, si bien también se usa la desviación estándar relativa de la media, el coeficiente de variación y la varianza. También se acepta la comparación de resultados con un método de referencia validado del que ya se ha demostrado su exactitud; entonces el valor verdadero es el que se obtiene con dicho método de referencia y se compara con el valor hallado del método nuevo que se quiere validar. Se expresa matemáticamente como la desviación estándar, **s**, o más comúnmente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV).

El estimador de la desviación estándar se calcula como:

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \text{Ecuación (8)}$$

Donde n: Numero de medidas; X_i : valor medido en el ensayo i; \bar{X} el estimador de media poblacional calculado como:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \text{Ecuación (9)}$$

Por su parte, la desviación estándar relativa o coeficiente de variación se calcula como:

$$RSD = \frac{s \cdot 100}{\bar{X}} \quad \text{Ecuación (10)}$$

- Repetibilidad: Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método en ítems de análisis idénticos en el mismo laboratorio con el mismo operador utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo.

Se puede determinar registrando a lo menos 6 mediciones bajo las mismas condiciones (mismo operador, mismo instrumento, mismo laboratorio y en corto intervalo de tiempo) de un analito en un Material de Referencia. Calcular la desviación estándar (s) y el porcentaje de coeficiente de variación (CV%).

- Reproducibilidad: Es la precisión bajo las condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método en ítem idénticos de análisis en condiciones diferentes ya sea de laboratorio, diferentes operadores, usando distintos instrumentos, entre otros.

3.1.8.5 Límite de detección y sensibilidad

El límite de detección de un analito por un método instrumental, puede definirse como aquella concentración que proporciona una señal instrumental significativamente diferente de la señal del "blanco" o señal de fondo. El término significativamente diferente debe aclararse en términos estadísticos. Si se realizan infinitas determinaciones sobre una muestra en blanco, los resultados se distribuirán en forma de curva de Gauss (figura 11.).

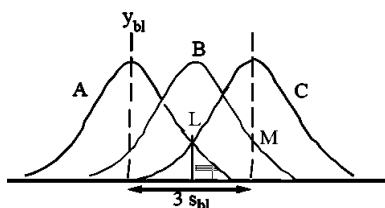


Figura 11. Límite de detección

Tomando un nivel de probabilidad del 95 % se puede definir un límite, L , por encima del cual se encuentren únicamente el 5 % de los resultados (parte sombreada en la figura 11.). Podría considerarse que éste es el límite de detección, por cuanto que un resultado situado por encima de L tiene únicamente un 5 % de probabilidades de pertenecer al blanco. Sin embargo, una muestra con una señal media, L , tendrá una distribución normal (curva B en la figura 11.), por lo que, en realidad, la probabilidad de concluir que esta muestra no difiere de la del blanco es del 50 %. Por ello, resulta

más adecuado considerar el valor medio, M , de una distribución gaussiana (figura 11), tal que el 5 % de sus valores se encuentren situados por debajo de L .

La **sensibilidad** de una técnica se define correctamente como la pendiente del calibrado, y si éste es lineal, puede medirse en cualquier punto de él. Sin embargo, el límite de detección de un método se calcula con ayuda de la zona del calibrado próximo al origen, y para ello se utiliza, tanto la pendiente, como la ordenada en el origen.

El "**intervalo útil**" de un método analítico se considera como el margen de concentraciones comprendido entre la concentración más pequeña a la que pueden realizarse medidas cuantitativas (límite de cuantificación, LC en la figura 12.) y la concentración a la que el calibrado se desvía de la linealidad (LL en la figura 12.)

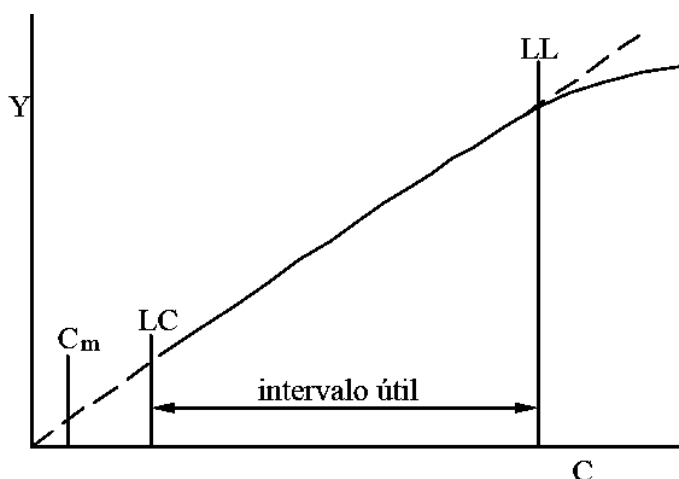


Figura 12. Intervalo útil.

El intervalo útil de los métodos analíticos deberá ser, al menos, de dos órdenes de magnitud.

Los métodos instrumentales son más sensibles que los métodos químicos. Esto implica que son capaces de detectar y determinar cantidades de analito mucho más pequeñas que los métodos clásicos, lo cual los hace particularmente útiles para el análisis de trazas, de gran importancia, por ejemplo, en muestras biológicas y medioambientales.

3.1.9 Robustez ^[37]

La robustez describe si un método analítico o instrumental es sensitivo a efectos externos, tales como diferentes instrumentos (electrodos, tituladores, etc.), tiempo y día del análisis, diferentes operarios o variación de las condiciones ambientales en diferentes laboratorios.

Para comprobar la robustez, los pasos de la validación deben ser repetidos con la misma muestra por diferentes personas en diferentes días.

Esta clase de comprobación también es recomendada, si posteriormente se obtienen resultados no satisfactorios:

- Durante ciertos pasos del procedimiento de la validación.
- Durante la aplicación de la rutina del método.

La rigidez describe la conducta de los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales (analíticas) perturbadas, tales como diferentes matrices de análisis (ejemplo, soluciones, reactivos, etc.), otras temperaturas de la solución del analito u otras condiciones relacionadas que puedan producir desviaciones.

3.1.10 Análisis de varianza anova ^[35]

La prueba Anova nos permite comparar las medias de r grupos, siendo r mayor o igual a 2. El modelo Anova presupone que las varianzas de los grupos son iguales y que los residuos o errores son aleatorios, independientes e idénticamente distribuidos siguiendo una ley normal con media 0 y desviación constante.

El Anova se puede utilizar en las situaciones en las que nos interesa analizar una respuesta cuantitativa, llamada habitualmente variable dependiente, medida bajo ciertas condiciones experimentales identificadas por una o más variables categóricas (por ejemplo tratamiento, sexo), llamadas variables independientes. Cuando hay una sola variable que proporciona condiciones experimentales distintas, el análisis recibe el nombre de Anova de un factor.

La varianza (σ^2), se define como la desviación estándar elevada al cuadrado, y se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$\sigma^2 = \frac{\sum(X - M^2)}{N - 1}$$

Donde X designa las puntuaciones o medidas individuales, M la media de la muestra; σ va a ser el símbolo de la desviación estándar de la muestra si no se indica expresamente que se trata del símbolo de la desviación típica de la población. En esta ecuación el denominador N-1 representa la estimación de la varianza de la población, la cual será usada en el propio análisis de varianza.

Para el análisis de varianza, se toma el numerador bajo el término de la *suma de cuadrados*, definiéndose básicamente como la suma de las diferencias de todos los datos con respecto a la media, elevadas previamente al cuadrado. Por su parte, el denominador, o los grados de libertad, o el número de sujetos menos uno, esta unidad es restada porque se trata de estimaciones de la varianza en la población.

La comparación entre las varianzas se realiza mediante el cálculo de la razón F, en la cual se divide una varianza en otra:

$$F = \frac{CMinter}{CMintra}$$

Donde CM es la suma de cuadrados medios, o varianza. En el numerador se tiene la diferencia entre las medias de las muestras, en el denominador, la varianza de los grupos. El valor resultante debe compararse con la entrada correspondiente de la tabla de valores críticos, en donde se espera que los datos y los analistas no tengan diferencias significativas; esto se cumple si el valor de F calculado es menor a los valores críticos comparados en la tabla, de acuerdo al nivel de confianza trabajado.

3.2 ESTADO DEL ARTE

La acumulación de contaminantes en suelos, recursos hídricos y cultivos como resultado de la presencia de residuos agroquímicos y varios contaminantes ambientales son producto de la excesiva actividad industrial, quema de combustibles fósiles, actividad volcánica y la minería. En el caso del cultivo del

cacao no es la excepción; actualmente este producto colombiano reporta la presencia de altos niveles de cadmio. La existencia de metales pesados en frutos tiene una relación directa con la composición del suelo, la disponibilidad de estos elementos y los procesos metabólicos intrínsecos de las plantas. La finalidad de la cuantificación de cadmio en el analito, es poder aportar datos confiables que ayuden a tener un control en la producción de alimentos, se cuantificará mediante polarografía con electrodo de carbón vítreo por medio de métodos analíticos.

La acumulación de residuos de cadmio en el medio ambiente ha sido un problema que se ha tenido en cuenta en los últimos años, y en la que todos los autores han coincidido acerca de su creciente riesgo y aumento debido a una única causa en general: La actividad antropogénica. Como se mencionó anteriormente, el uso de fertilizantes, la contaminación de aguas de riego por residuos industriales, emisiones por vehículos y otras fuentes, han sido las causas más mencionadas en los artículos revisados. Al ser evidente el impacto producido por este tipo de contaminación en la salud de las personas y la estabilidad del medio ambiente, se han realizado diversos estudios que han permitido dilucidar el grado de exposición de los consumidores, así como analizar sus posibles riesgos a corto, mediano o largo plazo.

En la revisión bibliográfica se tuvo en cuenta la incidencia de los contenidos de cadmio sobre varios ecosistemas, tanto acuáticos como terrestres, puntualizando finalmente en nuestro tema central: El contenido de cadmio en cacao. Adicionalmente, se revisaron las diferentes aplicaciones de la polarografía con electrodo de carbón vítreo en la realización de estudios que permitieron el análisis de trazas metálicas en diferentes muestras

3.2.1 Cadmio en suelos y cultivos

Diferentes autores y organizaciones han desarrollado diversos estudios respecto a la presencia de metales pesados en alimentos, suelos y recursos hídricos. Estudios como el de concentración de cadmio en partículas de diferentes tamaños de un suelo de la cuenca del lago de Valencia (Cristina González, Joana Thompson, Yadira Martínez, Nereida Sánchez 2010) nos señala mediante sus resultados que la concentración total de cadmio en el suelo resultó superior a lo que establecen las normativas en suelos agrícolas (0,7 mg/kg) y en sedimentos de origen lacustre (0,1-

1,5 mg/kg). Para las partículas más pequeñas se obtuvieron las mayores fracciones de cadmio hidrosoluble (6%) y cadmio unido a los carbonatos (24%). Se concluye que no existen diferencias significativas entre el tamaño de las partículas de suelo y la concentración total de Cd.

Bioacumulación y translocación de cadmio en cole (Brassica campestris L.) y el apio (Apium graveolens) cultivado en el suelo contaminado oasis, Noroeste de China (Yiming Yang, Zhongren Nan, Zhuanjun Zhao, Zhaowei Wang, Shengli Wang, Xia Wang, Wangqiang Jin, Cuicui Zhao 2011)

Este artículo nos muestra que se presentan efectos de estrés sobre el crecimiento de las verduras en donde la biomasa de las hortalizas frescas en raíces y brotes aumentó en un primer momento, y alcanza el valor máximo, luego disminuyó con el aumento de la concentración de Cd en el suelo. Cuando el tratamiento de nivel de Cd era de 2,10 mg / kg, la biomasa fresca de los retoños de cole alcanzaron el valor máximo ($27,56 \pm 6,04$ g / maceta), aumentado en un 88,6%, en comparación con el control, lo que indica que este valor era umbral peligroso. Más allá de él, el crecimiento de Cole se inhibe. Del mismo modo, cuando el nivel de tratamiento de Cd fue de 1,05 mg / kg, la biomasa fresca de brotes de apio ha alcanzado el valor máximo ($6,73 \pm 2,74$ g / maceta), aumentó en un 127,4%, en comparación con el control, lo que indica que este valor era umbral peligrosos de Apio. Más allá de ello, el crecimiento de apio se inhibe. Estos resultados indican que el efecto tóxico de Cd en verduras tenía valores de umbral. El crecimiento de Verduras podía ser mejorada en bajas concentraciones de Cd (2,10 mg / kg para cole y 1,05 mg / kg para el apio), pero inhibido a altas concentraciones. Esta conclusión está de acuerdo con estudios previos (Song et al, 1996; Li et al, 2002; Zong et al., 2007). Los fenómenos probablemente se deben a las altas concentraciones de Cd dañando las raíces de las verduras, e inhibiendo la absorción de los elementos nutritivos en las raíces, entonces inhibe el crecimiento de los vegetales.

Revisión de las transferencias de cadmio del suelo a los seres humanos y sus efectos sobre la salud en el entorno de Jamaica

La preocupación por los efectos del cadmio en la salud humana ha llevado a numerosas directrices y regulaciones, ha limitar sus concentraciones en los suelos y los alimentos y la ingesta humana admisible. Estos tienen consecuencias socio-económicas en términos de uso de la tierra y la comercialización de los alimentos. Los suelos de bauxita en Jamaica, contienen órdenes de magnitud mayores en las concentraciones normales de cadmio, que resulta en elevadas concentraciones de

Cd en varios productos alimenticios siendo transferidos en los seres humanos, representando un factor de riesgo para el aumento de la mortalidad y / o morbilidad en el local de poblaciones. La presente revisión se centra en los suelos y los alimentos y las enfermedades de alta incidencia especialmente de cáncer y enfermedades renales que han sido tradicionalmente asociados con cadmio. En vista de las concentraciones notables de cadmio involucrado en Jamaica, y los informes a menudo contradictorios en la literatura, parece que aún queda mucho por aprender acerca de ciertos detalles de la toxicidad del cadmio.

3.2.2 Cadmio en ecosistemas acuáticos

El destino de cadmio en los suelos en el campo de la llanura del Danubio (Lubomir Lichner, Pavel Dlapa, Miloslav Sir, Andrea Cipakova, Beata Houskova, Pavol Fasko, Viliam Nagy)

La investigación llevada a cabo en suelos ribereños del río Danubio muestra que en suelos con tamaños de partícula por debajo de 0,01mm. La absorción de cadmio llevada a cabo es más fácil y rápida comparada con la que se da en suelos con tamaño de partícula más grande. Estos tamaños de partícula son característicos de procesos erosivos, llevados a cabo por agua o viento, por lo que se concluye que los procesos de erosión en suelos son determinantes en el aumento de la concentración de cadmio en los suelos de cultivo. Es así que otras actividades antropogénicas que favorezcan la erosión, tales como la tala de árboles, o la quema provocada de vegetación para la posterior siembra del suelo, así como muchas otras actividades; se han convertido junto con la industrialización en generadores claves de estos problemas ambientales que afectan la salud humana.

Cinética de la acumulación de cadmio y la eliminación en carpa Cyprinus carpio (Christine de Conto Cinier, Michelle Petit-Ramel, René Faure, Daniel Garin, Yvette Bouvet)

Carpa (*Cyprinus carpio*) se probaron para la acumulación de cadmio y la eliminación durante y después de una exposición a la contaminación. La concentración de cadmio se mantuvo a 53 µg en un acuario y 443 µg en el otro acuario para 127 días. La fase de exposición fue seguida por un período de depuración de 43 días. La acumulación de cadmio en el hígado, riñón y músculo era medida por medio de ICP-MS. Los datos mostraron que la exposición al cadmio produce absorción de cadmio significativa en los tejidos. Las concentraciones de cadmio aumentaron de forma

pronunciada en los riñones y el hígado, mientras que el nivel de contaminantes en el músculo sólo fue significativo después de 106 días. Después de 127 días de exposición (53 µg), la concentración de cadmio en el riñón fue 4 veces mayor que en el hígado y 50 veces más alta que en el músculo para un nivel tóxico de 53 µg. En un Cd de 443 µg, contenido de cadmio renal fue 2 veces mayor que en hígado y 100 veces mayor que en el músculo. En el riñón y el hígado, la concentración tóxica aumentó a medida que la concentración de contaminante en agua va aumentando. Durante los 43 días de depuración, la pérdida de cadmio acumulada fue rápida e inmediata en el músculo.

3.2.3 Disponibilidad de cadmio en cacao

*Efecto de dos fuentes de carbonato de calcio (CaCO_3) sobre la disponibilidad de cadmio para plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en suelos de Barlovento, estado Miranda (Francisco Contreras, Teodoro Herrera y Alexis Izquierdo)*

En dos suelos de características contrastantes Cumbo (Troporthents) y Tapipa (Typic dystrochrepts), procedentes de la región de Barlovento estado Miranda, se estableció un ensayo de invernadero durante cinco meses, con el objetivo de determinar mediante análisis foliar, el efecto del carbonato de calcio (CaCO_3), sobre absorción del cadmio (Cd) por plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.). Adicionalmente se utilizaron dosis de cloruro de calcio (CaCl_2) para diferenciar el efecto que ocurre mediante el incremento de pH y el resultado del incremento de la concentración del calcio en el complejo de cambio. Se evaluó la dinámica del calcio (Ca) en las plantas, al finalizar se determinó el Cd total y el Cd intercambiable en los suelos para comparar con su concentración inicial. Los resultados indican que en ambos suelos disminuyó la absorción del cadmio por las plantas al utilizar CaCO_3 . La concentración de calcio en las hojas aumentó con las cantidades de calcio aplicadas en los tratamientos. Por efecto de los tratamientos de CaCO_3 la cantidad de Cd intercambiable del suelo disminuyó con respecto al testigo en los dos suelos. La materia seca, tanto en Troporthents como en Typic dystrochrepts aumentó en comparación con el tratamiento testigo al aplicarse las dosis de carbonato de calcio. Los tratamientos de cloruro de calcio (CaCl_2) disminuyeron la absorción del cadmio por las plantas y el Cd intercambiable del suelo, el efecto fue menor al compararse con los tratamientos de CaCO_3 .

4. MARCO LEGAL

Para este trabajo se tuvo en cuenta lo establecido en el programa conjunto de FAO/OMS sobre normas alimentarias, comité del codex sobre contaminantes de los alimentos en la novena reunión realizada en delhi, india, en las fechas 16- 20 de marzo de 2015 recomienda que:

4.1 Recomendaciones FAO/OMS

1. se presenta la siguiente tabla que contiene los valores de niveles máximos (NM), de Cd para chocolate y productos derivados del cacao que proteja la salud de sus consumidores y asegure prácticas equitativas en el comercio de los alimentos.

2. Una vez que se ha recabado información disponible y analizado la misma, el GTE se permite recomendar que se tome en consideración los NM descritos en la tabla, debido a que sintetiza los diferentes estudios realizados por varios países y organismos internacionales sobre el contenido de cadmio en el chocolate y productos derivados del cacao, así como la exposición en la dieta del ser humano. No obstante, el análisis de esta información sugiere que es necesario realizar estudios sobre esta temática, tales como:

3. Influencia de la cantidad de sólidos de cacao en la concentración de cadmio en cacao.

4. Un estudio para determinar el contenido de cadmio en los ingredientes con los que se elabora el chocolate y derivados del cacao por ejemplo azúcar, leche, etc.

Tabla 1. Propuestas de niveles máximos para el cadmio en el chocolate y productos derivados de cacao para observaciones

Productos	Nivel máximo de Cadmio mg/kg
1. Chocolate con leche con un contenido de materia seca total de cacao <30%.	0,20
2. Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao <50%; chocolate con leche con un contenido de materia seca total de cacao ≥30%.	0,60
3. Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao ≥50%.	2,0
4. Cacao en polvo vendido al consumidor final o como ingrediente en cacao en polvo edulcorado vendido al consumidor final (chocolate para beber)	1,5

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 FASES DE LA INVESTIGACIÓN

5.1.1 Fase 0: revisión bibliográfica

La Recopilación de la información se realizó a partir de libros, tesis, artículos científicos, consulta en páginas de Internet y bases de datos de revistas electrónicas. Con relación a la cuantificación por voltamperometría con electrodo de carbón víreo, voltamperometría con electrodo de mercurio y técnicas analíticas paralelas.

5.1.2 Fase 1: Preparación de la muestra

Se realizó muestreo aleatorizado para recolección del fruto en donde se escogieron dos especies (E.E.T8 Estación Experimental Tenesis 8 representada con la letra A y C.C.N.51 Colección Castro Naranjales 51 representada con la letra B), por ser las más abundantes en la zona de muestreo, se preparó la muestra mediante una digestión ácida con una mezcla de ácidos concentrados. En donde la muestra sólida es sometida a cenizas, seguido se adicionan los ácidos concentrados para así generar una solución en donde esté presente el metal de interés (Cd) ; para la preparación de la matriz las cenizas obtenidas fueron filtradas y lavadas con HCl 0,1 N y agua tipo HPLC la solución obtenida en el filtrado se utilizó para su respectivo análisis

5.1.3 Fase 2 preparación de la curva de calibración

Para la elaboración de la curva de calibración fue necesario preparar un blanco el cual no debe tener presencia del metal, se prepararon soluciones estándares de Cd a diferentes concentraciones. Se midieron las intensidades y se trazó una curva de calibración graficando, la intensidad contra sus respectivas concentraciones.

5.1.4 Fase 3 Cuantificación de cadmio en el cacao

Se llevó a cabo mediante el procesamiento de la información obtenida. Comparando y correlacionando la variable dependiente vs la variable independiente con ayuda de programas estadísticos y con su respectivo análisis.

5.1.5 Métodos de análisis y tratamientos de datos e información

Con la información obtenida se trató estadísticamente usando SpSS, en donde se llevó a cabo análisis de varianza (ANOVA), utilizando el test a posteriori de Fisher de comparación de medias, con un nivel de significación del 95% de igual manera, utilizando el diagramas de caja a cada una de las muestras de cuantificación; con el fin de determinar si hay o no diferencia significativa entre la exactitud de las medidas y, la presencia de puntos críticos y/o atípicos dentro del grupo de datos.

5.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PATRÓN

5.2.1 Preparación de solución patrón de cadmio

Se prepararon dos soluciones patrón de 30 y 100 ppm a partir de un estándar de cadmio de 1000 ppm; a partir de las soluciones preparadas se elaboraron disoluciones para medir estándar alto, estándar bajo y así realizar curva de calibración ^[38].

5.2.2 Solución reguladora de pH Britton-Robinson (Electrolito Soporte)

Se prepararon 100 mL de una solución, mezclando ácido bórico (1,236 g); ácido acético (1,12 mL) y ácido fosfórico (0,96 mL); se adicionaron 10 mL de hidróxido de sodio 1M hasta obtener un pH=4,8, midiendo con el pH-metro. ^[38]

5.2.3 Solución de trabajo para la adición del metal

Se adiciono en una celda electroquímica 3 ml de agua tipo HPLC junto con 4 ml de solución reguladora de Britton-Robinson; seguido se adiciono un volumen de solución estándar de cadmio (a partir de las soluciones de 30 y 100 ppm).

5.3 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Se pesaron 10 g de la nuez del fruto por triplicado, la muestra fue depositada en crisoles previamente curados (los cuales fueron sometidos a 800°C durante 4 horas). Los crisoles fueron trasladados a la mufla mediante un desecador, la temperatura de calcinación estuvo en un rango de 400°C durante 8 horas, se dejaron enfriar y posteriormente se pesaron.

Las cenizas obtenidas se sometieron a digestión acida con ácido nítrico (2mL), ácido clorhídrico (1mL) y ácido sulfúrico (2 gotas), con una concentración del 98% de pureza. La solución obtenida es llevada a sequedad, se realizó un lavado con agua caliente tipo HPLC y ácido clorhídrico, con la muestra filtrada obtuvimos la solución presenciando el metal de interés (Cd).

5.4 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS GENERALES PARA LA EJECUCIÓN DE ANÁLISIS

5.4.1 Método de investigación

El método fue analítico debido a que se partió de procesos previos, llevando a cabo una digestión ácida de donde se extrajo la muestra la cual se analizó mediante voltamperometría.

5.4.2 Población y muestra

La población que se tomó corresponde al género *Theobroma cacao* L, seleccionado como muestra el grano del cacao proveniente del occidente de Boyacá para la cuantificación de cadmio, se analizó y evaluó la materia prima de la cual partimos

5.4.3 Hipótesis

Hipótesis nula

La técnica de voltamperometría permitirá cuantificar la presencia de cadmio en el cacao realizando comparativos con métodos como absorción atómica.

Hipótesis alternativa

La técnica de voltamperometría no permitirá cuantificar la presencia de cadmio en el cacao realizando comparativos con métodos como absorción atómica.

5.4.4 Diseño de experimentos

El diseño experimental con el cual se llevará a cabo dicha investigación es completamente aleatorizado.

5.4.5 Variables para la cuantificación de cadmio

En la cuantificación de cadmio presente en el caco existen variables, como la concentración, especie y método.

- **variable dependiente**

Contenido de cadmio presente en ppb de la muestra

- **variable independiente**

- ✓ la técnica de análisis voltamperometría con electrodo sólido y voltamperometría de redisolución anódica.
- ✓ La especie EET8 Y CCN51 a analizar es un factor determinante para la cuantificación de Cadmio.

5.4.6 Análisis Estadístico

La recopilación de datos en la respectiva investigación se realizó mediante la ayuda del programa estadístico SpSS, en donde se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) y se estableció la linealidad, precisión, exactitud y robustez del método

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 PARÁMETROS GENERALES DETERMINADOS PARA LA EJECUCIÓN DE LAS MEDIDAS

Para cada método utilizado en la determinación de cadmio en cacao se determinaron los parámetros generales mediante ensayos preliminares. Respecto al método de pulso diferencial de redisolución anódica el parámetro correspondiente al tamaño de la gota de Hg no fue modificado debido a que el equipo no lo permitió. La tabla 2 y 3 muestra las condiciones para cada método de ejecución en el equipo:

Tabla 2. Condiciones de trabajo para Voltamperometría de onda cuadrada (Carbón vítreo)

Método	Voltamperometría de onda cuadrada (carbón vítreo)
Potencial inicial (mV)	-400
Potencial final (mV)	-1000
Desoxigenación de la muestra	60 segundos mediante burbujeo de N ₂
Velocidad de barrido (mV/seg)	20
Tiempo de deposición (segundos)	15
Tiempo de reposo (segundos)	5

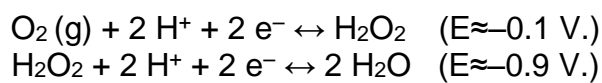
Tabla 3. Condiciones de trabajo para Voltamperometría diferencial de pulso de redisolución anódica

Método	Voltamperometría diferencial de pulso de redisolución anódica
Potencial inicial (mV)	-400
Potencial final (mV)	-800
Desoxigenación de la muestra	60 segundos mediante burbujeo de N ₂
Velocidad de barrido (mV/seg)	20
Tiempo de deposición (segundos)	90
Tiempo de reposo (segundos)	10

6.2 FACTORES A TENER EN CUENTA EN EL MOMENTO DE REALIZAR MEDIDAS MEDIANTE VOLTAMPEROMETRIA

6.2.1 Desoxigenación de la muestra

Una interferencia en las señales voltamperométricas e inherente a voltamperometría, es la presencia de oxígeno gaseoso en la muestra a analizar. Esta interferencia se genera mediante las siguientes reacciones.



Es un parámetro a tener en cuenta, debido que la presencia de oxígeno gaseoso interfiere en las señales generando voltamperogramas indefinidos. La forma usual de eliminar el oxígeno disuelto, es burbujear argón o nitrógeno durante unos minutos a través de la disolución conteniendo el analito.

6.2.2 Rangos de potencial

Para la cuantificación de Cd^{2+} se trabajó con rangos de 0,60 a 0,90 V para voltamperometría con electrodo de carbón vítreo y rangos de 0,40 a 0,70 V para voltamperometría con electrodo de mercurio

6.3 PREVALIDACIÓN DEL MÉTODO

6.3.1 Tratamiento de la muestra

Se someten a calcinación las muestras de cacao a temperaturas de 400 °C, se somete a esta temperatura pues a temperaturas elevadas se empiezan a formar diferentes sustancias como cloruros, de igual manera la temperatura de sublimación del metal de interés es sobre los 700°C

6.3.2 Curva de calibración

Las figuras 13 y 14 muestran los voltamperogramas de las curvas de calibración obtenidas, las figuras muestra las intensidades de medidas de un estándar de cadmio a diversas concentraciones. Podemos observar como sufre un aumento en la intensidad (señalada en el eje y) a medida que aumenta la concentración; en las figuras 15 y 16 observamos las gráficas resultantes de la linealidad de la curva, según el valor obtenido en el coeficiente de correlación, la intensidad es directamente proporcional a la concentración.

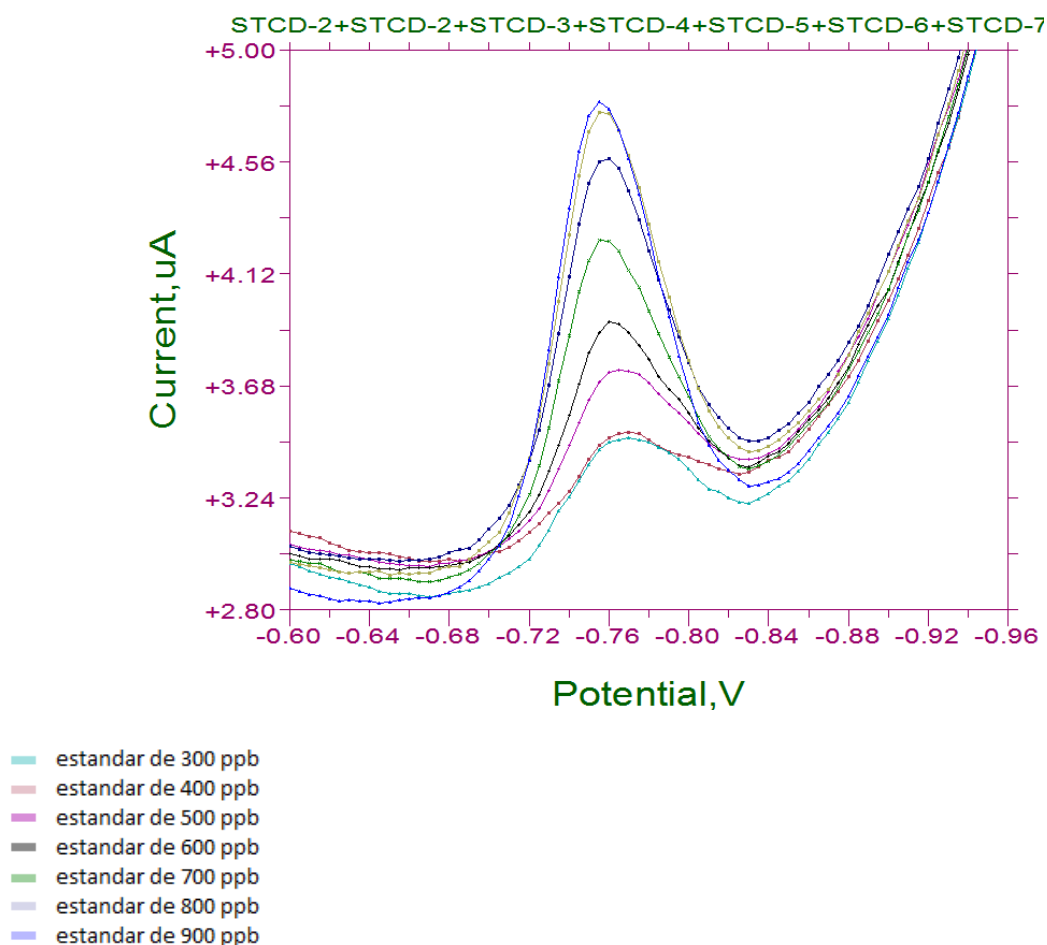


Figura 13. Voltamperograma de las medidas de concentración para la curva de calibración con electrodo de carbón vítreo.

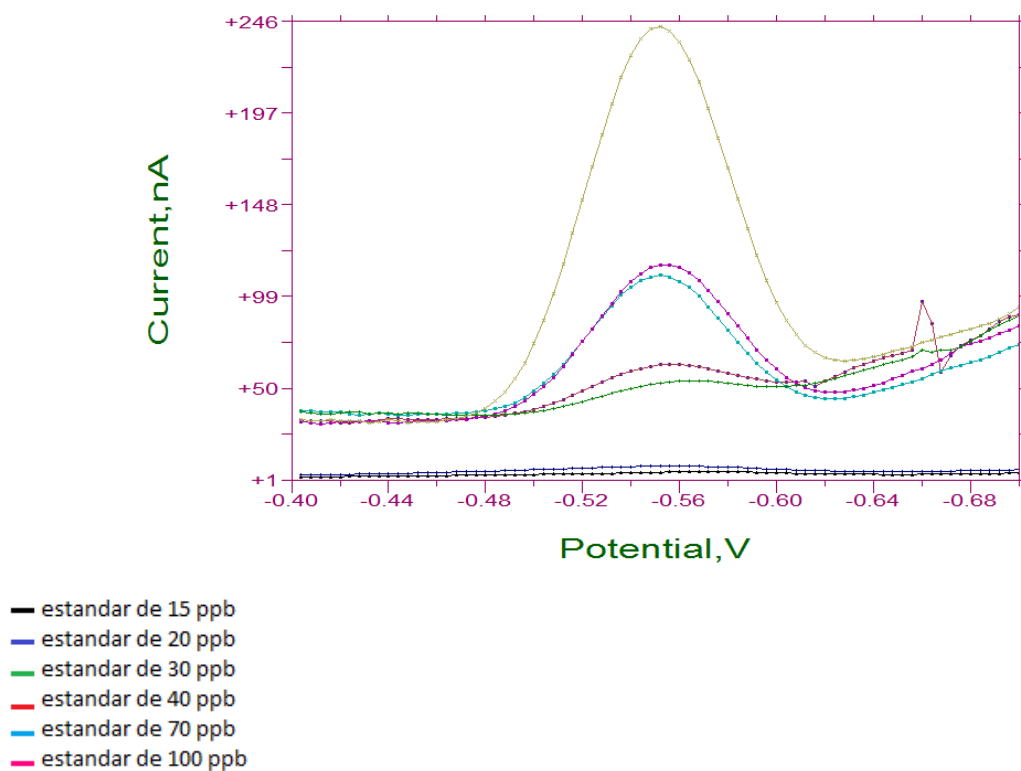


Figura 14. Voltamperograma de las medidas de concentración para la curva de calibración con electrodo de mercurio.

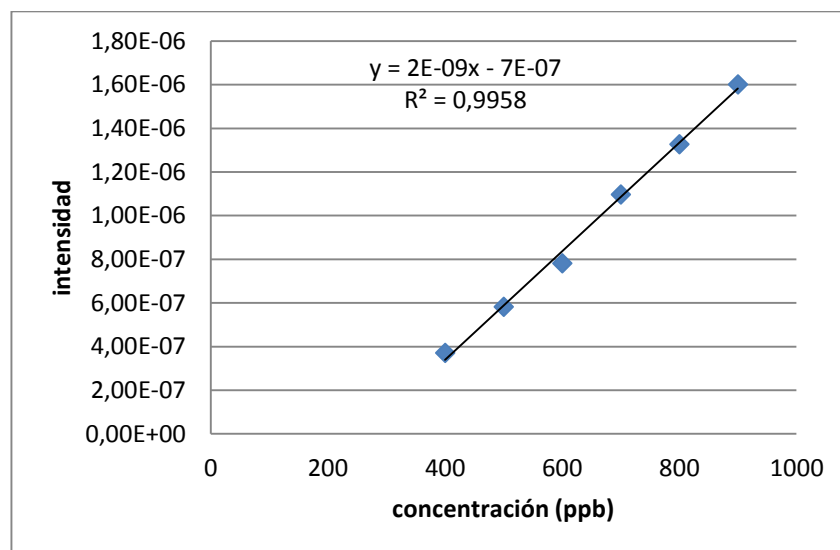


Figura 15. Curva de calibración para cadmio con electrodo de carbón vítreo

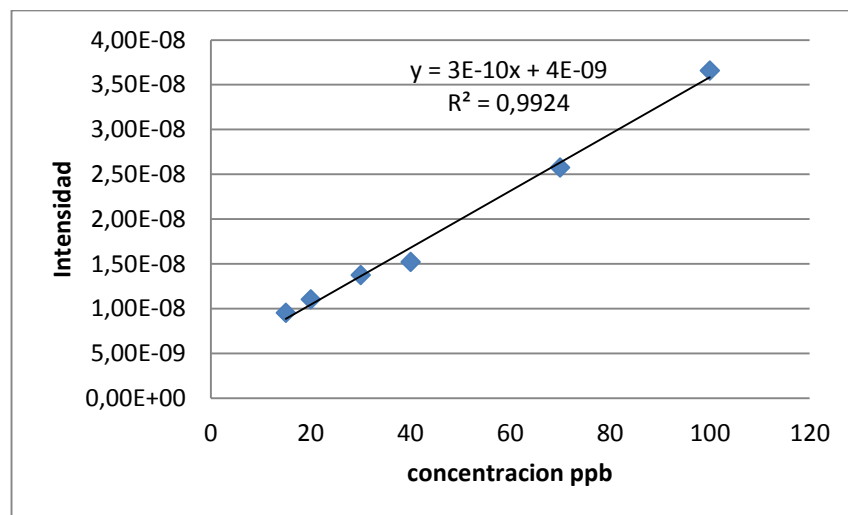


Figura 16. Curva de calibración para cadmio con electrodo de mercurio

6.3.3 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección como de cuantificación fueron generados de manera experimental, teniendo en cuenta la metodología planteada se obtuvieron valores no menores a 300 ppb para voltamperometría con electrodo solido (carbón vítreo), y valores no menores a 15 ppb para polarografía (electrodo de mercurio) debajo de estos límites no presenta señales. Para el límite de cuantificación se encontró que a valores mayores a 900 ppb para voltamperometría con electrodo sólido y para valores mayores a 100 ppb para polarografía se pierde la linealidad.

6.4 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS

Para la validación de los métodos propuestos se tuvieron en cuenta los parámetros para el instrumento respecto a cada electrodo de trabajo, se mantienen las condiciones expuestas en el literal 6.1, se hizo una revisión de los parámetros ya mencionados. Mediante la medida de 6 estándar bajos, 6 estándar altos, 6 muestras naturales, 6 muestras con adición de estándar bajo y 6 muestras con adición

de estándar alto, se validaron los métodos. Las concentraciones utilizadas fueron para voltamperometría con electrodo sólido estándar bajo 400 ppb y estándar alto 900 ppb y para voltamperometría remotría con electrodo de mercurio estándar bajo 15 ppb y estándar alto 150 ppb. Se trabajó la reproducibilidad y robustez de los métodos mediante los resultados obtenidos de las corridas de estas muestras por dos analistas, las cuales se realizaron por triplicado.

6.4.1 RESULTADOS PARA VOLTAMPEROMETRIA CON ELECTRODO DE CARBÓN VÍTREO Y VOLTAMPEROMETRIA CON ELECTRODO DE MERCURIO O POLAROGRAFIA

6.4.1.1 Resultados para estándar bajo

La figura 17 muestra un voltamperograma obtenido mediante la medida de la intensidad de un estándar bajo.

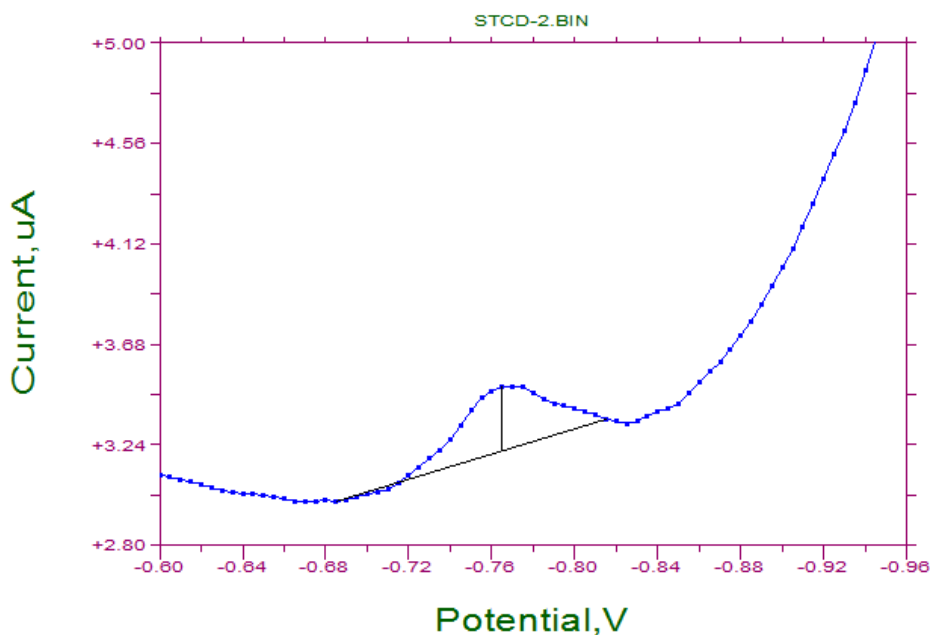


Figura 17. Voltamperograma estándar bajo (400 ppb)

6.4.1.2 Resultado para estándar alto

La figura 18 muestra un voltamperograma obtenido mediante la medida de la intensidad de un estándar alto.

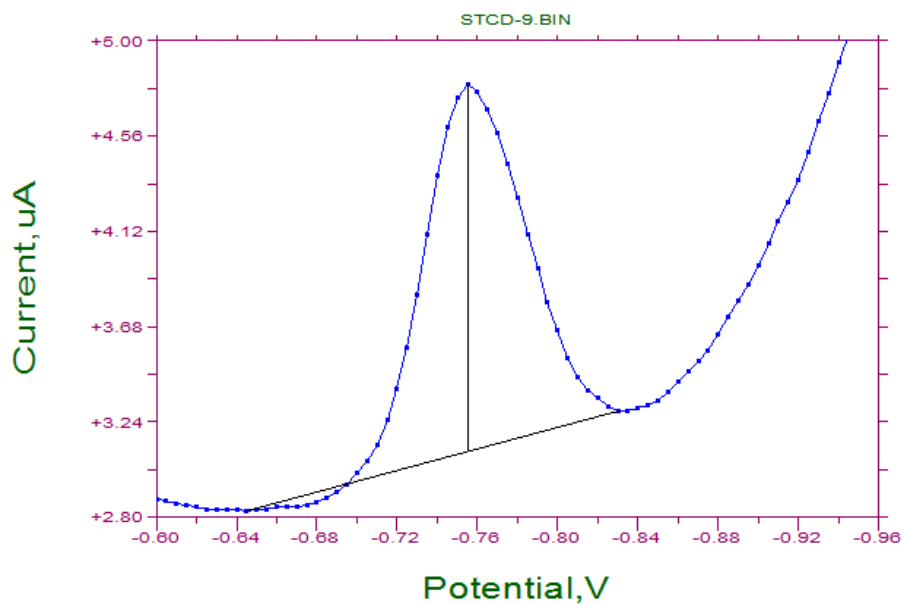


Figura 18. Voltamperograma estándar alto (900 ppb)

6.4.1.3 Resultados para muestras con adición de estándar bajo y alto

Se realizaron medias para muestras naturales, estas no arrojaron lectura; se adiciono estándar bajo y alto a las muestras y se analizaron dando como resultado los datos mostrados en el anexo 5.

6.4.2 PARTICULARIDADES DEL MÉTODO

6.4.2.1 Precisión

Se determinó la precisión con base a la reproducibilidad y repetitividad para cada método, expresadas mediante el coeficiente de variación o desviación estándar relativa en porcentaje (%RSD); realizadas a los resultados obtenidos para estándar bajo, estándar alto, muestra y muestra con adicionado respectivamente, como se puede observar en las siguientes tablas. Cabe resaltar que el método de voltamperometría con electrodo de mercurio es preciso, se puede evidenciar en los valores del coeficiente de variación mostrados en las tablas 4, 5, 6 y 7, los cuales no superan el 10%; tanto para las muestras por analista (repetitividad) como para los resultados entre analistas (reproducibilidad, notada por el subíndice m). Para voltamperometría con electrodo carbón vítreo podemos decir que este método es menos preciso, debido a los valores del coeficiente de variación obtenidos pues superan el 10 % como se puede observar en las tablas 8, 9, 10 y 11, de igual manera se puede decir que este método es reproducible, pero no es repetitivo con respecto a los promedios de cada analista.

6.4.2.2 Resultados para voltamperometría con electrodo de mercurio o polarografía

Tabla 4. Precisión para el estándar bajo

Estándar bajo 15 ppb	X	S	%RSD	X _m	S _m	%RSD _m
analista 1	15,61	0,85	5,48	15	0,29	7,28
analista 2	15,20	1,38	9,08			

Tabla 5. Precisión para el estándar alto

Estándar alto 150 ppb	X	S	%RSD	X _m	S _m	%RSD _m
analista 1	141,96	5,92	4,17	141	1,42	2,81
analista 2	139,96	2,05	1,46			

Tabla 6. Precisión para muestra A con adición de estándar bajo (15 ppb)

Muestra A + adicionado (15 ppb)	X	S	%RSD	X _m	S _m	%RSD
analista 1	46,54	5,52	11,86	44	3,49	10,32
analista 2	41,59	3,65	8,78			

Tabla 7. Precisión para muestra B con adición de estándar alto (150 ppb)

Muestra B + adicionado (150ppb)	X	S	%RSD	X _m	S _m	%RSD
analista 1	157,98	8,44	5,34	155	4,45	4,53
analista 2	151,69	5,65	3,73			

6.4.2.3 Resultados para voltamperometría con electrodo de carbón vítreo

Tabla 8. Precisión para el estándar bajo

Estándar bajo (400 ppb)	X	S	%RSD	X _m	S _m	%RSD _m
analista 1	634,50	51,34	8,09	626	12,02	11,99
analista 2	617,50	98,14	15,89			

Tabla 9. Precisión para el estándar alto

Estándar alto (900ppb)	X	S	%RSD	X _m	S _m	%RSD _m
analista 1	1447,50	61,52	4,25	1523	106,89	11,92
analista 2	1598,67	313,14	19,59			

Tabla 10. Precisión para muestra A con adición de estándar bajo (400 ppb)

Muestra A + estándar bajo(400 ppb)	X	S	%RSD	X _m	S _m	%RSD _m
analista 1	574,44	68,04	11,84	543	44,41	9,24
analista 2	511,64	33,96	6,64			

Tabla 11. Precisión para muestra B con adición de estándar alto (900 ppb)

Muestra B + estándar alto(900 ppb)	X	S	%RSD	X _m	S _m	%RSD _m
analista 1	1134,67	622,71	54,88	1107	38,94	53,25
analista 2	1079,60	554,54	51,37			

Para conocer la precisión de los métodos mediante la determinación del % RSD, se tuvo en cuenta el promedio de las concentraciones halladas representada con la letra X y la desviación estándar de dichas concentraciones representada con S

6.4.2.4 Porcentaje de recuperación

En las tablas 12 y 13 se muestran la eficiencia del método de extracción el cual se determinó en porcentajes de recuperación para cada uno de los métodos, valores que se encuentra aproximadamente entre el 70 % para cada uno de los experimentos.

Tabla 12. Porcentaje de recuperación para voltamperometría con electrodo de mercurio.

voltamperometría con electrodo de mercurio				
muestra	%R	X	S	%RSD
A1	68	68	0,5774	0,84
A2	69			
A3	68			
B1	69	69	0,5774	0,84
B2	69			
B3	68			

Tabla 13. Porcentaje de recuperación para voltamperometría con electrodo de carbón vítreo.

voltamperometría con electrodo de carbón vítreo				
muestra	%R	X	S	%RSD
A1	68	69	1,0438	1,52
A2	69			
A3	69			
A4	70			
A5	68			
B1	71	69	0,9703	1,40
B2	69			
B3	68			
B4	68			
B5	70			

6.5 RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

En la tabla 14 y 15 se muestran los resultados de cuantificación obtenidos de las muestras de cacao para el método de electrodo de carbón vítreo y mercurio respectivamente, estos resultados son comparados con los datos obtenidos en un laboratorio externo mediante el método de absorción atómica por detector de ionización de flama (FID), datos mostrados en la tabla 16. Podemos observar que para voltamperometría con electrodo de carbón vítreo la muestra A presenta un mayor contenido de cadmio que la muestra B, alrededor de 63 ppb; en el caso de voltamperometría con electrodo de mercurio, podemos observar que la tendencia es diferente pues la muestra B presenta un mayor contenido de cadmio, alrededor de 1353 ppb; al comparar los resultados obtenidos en voltamperometría con los de absorción atómica podemos decir que el método más cercano es el de voltamperometría con electrodo de mercurio.

Tabla 14. Resultados de cuantificación para voltamperometría con electrodo de carbón vítreo

MUESTRA	voltamperometría con electrodo de carbón vítreo				
	IP	CONCENTRACIÓN PPB	X	S	%RSD
A	6,49E-07	168	216	41,86	19,37
	7,26E-07	243			
	7,15E-07	237			
B	6,33E-07	148	153	6,56	4,28
	6,31E-07	152			
	6,42E-07	161			

Tabla 15. Resultados de cuantificación para voltamperometría con electrodo de mercurio.

MUESTRA	voltamperometría con electrodo de mercurio				
	IP	CONCENTRACIÓN PPB	X	S	%RSD
A	4,16E-08	1535	1542	39,49	2,56
	5,61E-08	1585			
	3,43E-08	1507			
B	1,01E-07	2848	2895	64,22	2,22
	5,13E-08	2968			
	5,12E-08	2868			

Tabla 16. Resultados de cuantificación obtenidos por espectroscopia de absorción atómica

Espectroscopia de Absorción atómica				
Muestra	Concentración en ppb	X	S	%RSD
A	1546	1624	68,06	4,19
	1660			
	1667			
B	2782	2771	35,28	1,27
	2732			
	2800			

Según La FAO/OMS estipula que los niveles máximos de Cadmio en mg/kg son de 1,5 para cacao en polvo vendido al consumidor final o como ingrediente en cacao en polvo edulcorado vendido al consumidor final (chocolate para beber)

6.5.1 Análisis de varianza

6.5.1.1 Análisis de varianza para muestra A y B

Se puede observar en el análisis (anexo 3 y 4) que los métodos no tienen similitud estadística según los datos arrojados, encontrando diferencia significativa en las medidas. La prueba F realizada en este análisis muestras que no se supera el valor de F crítico, el estudio realizado permite concluir que a un nivel de confianza del 95%, no existen diferencias significativas en los datos arrojados para la concentración hallada por voltamperometría de electrodo de mercurio comparados con los datos arrojados por el método de absorción atómica. Pero si difiere en los resultados hallados por voltamperometría con electrodo solido debido a que el electrodo sufre una protonación arrojando valores distantes como se observan en las figuras 19, 20, 21 y 22.

Figura 19. Gráfico de barras para muestra A

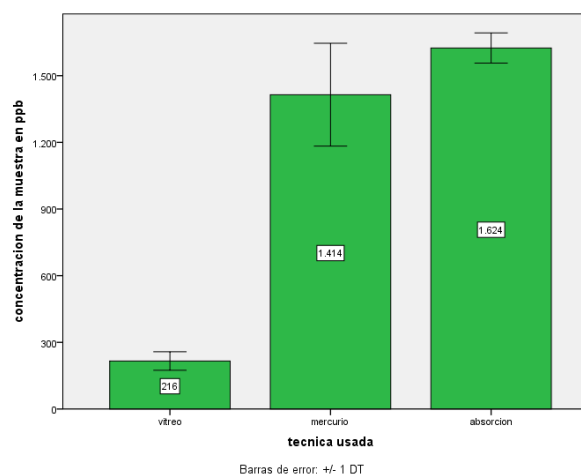


Figura 20. Diagrama de caja para muestra A

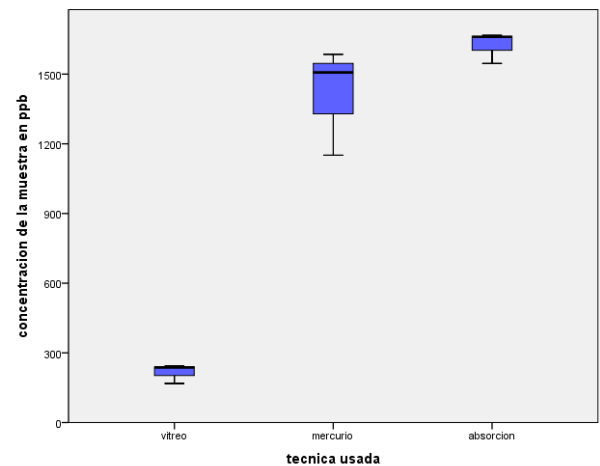


Figura 21. Gráfico de barras para muestra B

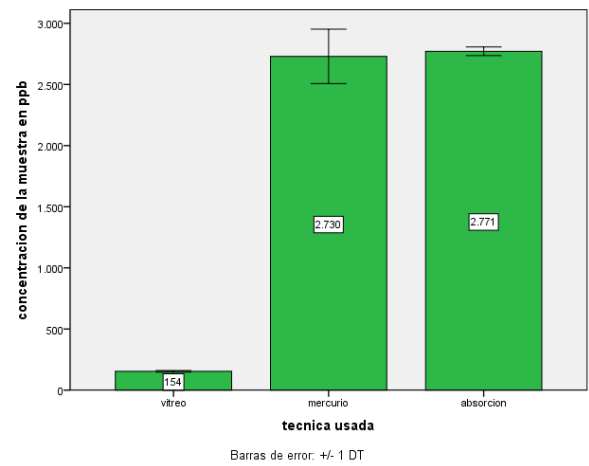
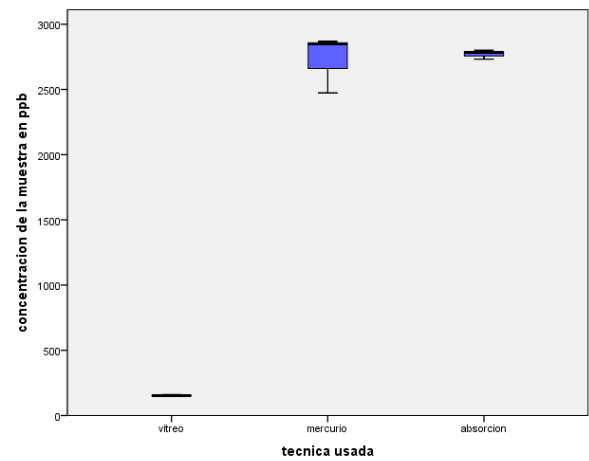


Figura 22. Diagrama de cajas muestra B



7. CONCLUSIONES

- Los valores arrojados en la validación y cuantificación muestran que la técnica más precisa es la de voltamperometría con electrodo de mercurio puesto que los resultados en %RSD dan valores de 2,56 y 2,22 por ciento valores que no superan el 10 %.
- Los resultados obtenidos en la validación y cuantificación muestran que la técnica de voltamparemotría con electrodo solido (carbón vítreo), el método no cumple con los niveles de exactitud.
- La cuantificación muestra valores obtenidos para voltamperometría con electrodo de mercurio entre 1507 a 1585 ppb para la muestra E.E.T8 y 2848 a 2968 ppb para la muestra C.C.N.51 valores que no son distantes comparados con los resultados obtenidos en un laboratorio externo mediante el método de absorción atómica.
- Según lo estipulado por la FAO/OMS los valores encontrados de Cd están por encima de los niveles máximos permisibles de ingesta de cacao en polvo, de 1,5 mg/kg (1500 ppb)
- Con esta investigación se establece la confiabilidad de un método voltamperométrico de análisis para la determinación de Cd, puesto que permite mayor sensibilidad y selectividad encontrando similitud con métodos robustos como Espectroscopia de Absorción Atómica,

8. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios más amplios al fruto del cacao mediante voltamperometría con electrodo de mercurio con base a las especies existentes
- Realizar estudios de igual manera para suelos y recurso hídricos
- Ampliar el estudio realizando análisis para diferentes metales como cromo, plomo, mercurio entre otros.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] **F. Soares, N. Moura, S. Sánchez, E. Valdés, I. Blabín.** Mecanismos de hiperacumulación de metales pesados en plantas
- [2] **M. Flores, S. Arroyo, B. Ortiz, G. Quiroz, L. Gutiérrez, M. Concepción.** Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular
- [3] **FEDECACAO.** Caracterización fisicoquímica y beneficio del grano de cacao (*theobroma cacao* L.) en Colombia - *Theobroma cacao* L. (1753). Publicado en: *Species Plantarum* 2: 782. 1753.
- [4] **Universidad de Belgrano.** Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Carrera de Farmacia Determinación de plomo y cadmio en hierbas medicinales
- [5] **P. Pérez García, M. Azcona Cruz.** Los efectos del cadmio en la salud.
- [6] **CODEX ALIMENTARIO.** Programa conjunto fao/oms sobre normas alimentarias comité del codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos
- [7] **Skoog, D., James, H., & Timothy, N.** (1991). Principios del análisis instrumental. Capítulos 21-33. (5th ed., pp. 691–694). Mc Graw Hill.
- [8] **Y. Yang, Z. Nan, Z. Zhao, Z. Wang, S. Wang, X. Wang, W. Jin, C. Zhao.** 2011 Bioacumulación y translocación de cadmio en cole (*Brassica campestris* L.) y el apio (*Apium graveolens*) cultivado en el suelo contaminado oasis, Noroeste de China
- [9] **L. Lichner, P. Dlapa, M. Sir, A. Cipakova, B. Houskova, P. Fasko, V. Nagy.** The fate of cadmium in field soils of the Danubian lowland. *Soil & Tillage Research* (2006) p. 154-165
- [10] **R. Sanabria.** Toxicidad y acumulación de cadmio en poblaciones de diferentes especies de *Artemia*. 2002. Universidad de Valencia.
- [11] **M. Jacinto. S. Aguilar.** Concentraciones de metales en especies marinas de la bahía de Huarmey, Ancash, Perú. *Rev. Perú. Biol.* 2007. 14(2): 307-311.
- [12] **E. Lozada, S. Monks, G. Pulido, A. Gordillo, F. Prieto.** Determinación de metales pesados en *Cyprinus Carpio* en la laguna de Metztitlan, Hidalgo, México. Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo.

- [13] **M. Rahaman, S. y M. Rahman.** Contaminación del agua y su impacto en las comunidades ecohidrológicas del río Buringanga en algunas zonas industriales del río Bangladesh. BMDF, Bangladesh. Universidad Agrícola de Bangladesh. 2009.
- [15] **C. Gonzalez, J. Thompson, Y. Martinez, N. Sanchez.** Concentración de cadmio en partículas de diferentes tamaños de un suelo de la cuenca del lago de Valencia. Revista de la Facultad de Ingeniería U.C.V., Vol. 25, N°2, pp. 73-80. 2010.
- [16] **G. Lalor.** Review of cadmium transfers from soil to humans and its health effects in the Jamaican environment. Science of total environment (2008) p. 162-172.
- [18] **DeVries W, Bakker DJ.** Manual for calculating critical loads of heavy metals for terrestrial ecosystem: guidelines for critical limits, calculation methods and input data. TNO Institute of Environmental Sciences, Energy Research and Process Innovation. The Netherlands: Den Helder; 1998. 144 pp.
- [19] **Howe A, HooFung L, Lalor GC, Rattray R, Vutchkov M.** Elemental composition of Jamaican foods 1: A survey of five food crop categories. Environ Geochem Health 2005; 27:19-30.
- [20] **T. Martínez, G. Zarazua, P. Avila-Perez, M. Navarrete, S. Tejaeda.** Total X-ray fluorescence analysis of trace-elements in candies marketed in Mexico. Spectrochimica Acta Part B (2010) p. 499-503
- [21] **A. Duran, M. Tuzen, M Soylak.** Trace metal contents in chewing gums and candies marketed in Turkey. Environ Monit Assess (2009) 149:283-289.
- [22] **S. Dahiya, R. Karpe, A. Hegde, R. Sharma.** Lead, cadmium and nickel in chocolates and candies from suburban areas of Mumbai, India. Journal of Food Composition and Analysis (2005) p. 517-52.
- [23] **Siegwart, Y., 1983,** Die Durchführung der Lebensmittelkontrolle in der Schweiz im Jahre 1982. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 74, 179–319.
- [24] **Fincke, A., 1989,** Analytische und technologische Entwicklungen auf dem Gebiet der Kakaoerzeugnisse. Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem., 43, 49.
- [25] **Ciurea, I. C. and Lipka, Y. F., 1992,** Occurrence of Cadmium in cocoa and Coffee. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 83, 197.

- [26] **Pedersen, G. A., Mortensen, G. K. and Larsen, E. H., 1994**,Beverages as a source of toxic trace element intake. *Food Additives and Contaminants*, 11, 351.
- [27] **S. Mounicou, J. Szpunar, D. Andrey, C. Blake, R. Lobinski.** Concentrations and bioavailability of cadmium and lead cocoa powder and related products. *Food Additives and contaminants*, 2003, Vol. 20, N° 4, 343-352.
- [28] **F. Contreras, T. Herrera, A. Izquierdo.** Efecto de dos fuentes de carbonato de calcio (CaCO_3) sobre la biodisponibilidad de cadmio para plantas de cacao (*Theobroma cacao L.*) en suelos de Barlovento, estado Miranda. *Venezuelos* 13:52-63
- [29] **Mortvedt, J.; P. Giordano y W., Lindsay. 1983.** Micronutrientes en agricultura. AGT.
- [30] **Beccaglia, A., & Llinares, A.** (n.d.). Instructivo de preparación, digestión y preparación de muestras (aguas, efluentes, alimentos y suelos) para análisis de metales por absorción atómica
- [31] **L. ROBLEDO VÉLEZ, A. CASTAÑO PUERTA 2010 tesis** validación de la metodología para el análisis de los metales cadmio y plomo en agua tratada por absorción atómica con horno de grafito en el laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la universidad tecnológica de pereira.
- [32] **Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodriguez, L., Soto, M.,... Sandoval, S. (2010).** Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos sobre la validación de métodos.”
- [33] **Allen J. Bard Larry R. SECOND EDITION ELECTROCHEMICAL METHODS** Fundamentals and Applications. Faulkner *Department of Chemistry and Biochemistry University of Texas at Austin* JOHN
- [34] **Taylor, J. K. (1993).** Validation of Analytical Methods. *Analitical Chemistry*, 6(6), 1–18
- [35] **Vallejo, P. M. (2012).** Introducción al Análisis de Varianza.
- [36] **Hernández, L., González, C. (2002).** Introducción al análisis instrumental segunda edición (tema 9).

- [37] **Clavijo, A.** Fundamentos de química analítica: equilibrio iónico y análisis químico primera edición (2002) pág. 46-47
- [38] **Silva, L., Vargas, P.** Validación del método: voltamperometría diferencial de pulso de redisolución anódica, para la cuantificación de Cd^{2+} en chocolate de mesa elaborado en el departamento de Boyacá (tesis)
- [39] **Harris, D.** (1999). Análisis químico cuantitativo. Capítulo 14 (5th ed., pp. 331-353)

10. ANEXOS

Anexo 1. Inventario de equipos

Equipo	Cantidad	Recomendaciones y/o observaciones
Polarógrafo, BAS CV-50W equipado con un analizador voltamperométrico, un electrodo de gotas de mercurio de crecimiento controlado y un electrodo sólido de carbón vítreo. El sistema está controlado por un PC, provisto del programa BAS CV-50W versión 2.0.	1 unidad	Equipo debidamente calibrado, se recomienda la no presencia de burbujas de aire en el capilar del electrodo de mercurio para su buen funcionamiento, de igual manera que el mercurio de uso no presente conductividad, para electrodo sólido como carbón vítreo se recomienda el lavado continuo del electrodo
pHmetro, Cole Parme WD35624-34	1 unidad	Equipo debidamente calibrado, se recomienda Prender el medidor de pH y permitir que se caliente. Inserte los electrodos en una solución reguladora de pH para no generar daños en el electrodo. Realice la medición seguido lave los con agua des ionizada y por ultimo lave nuevamente los electrodos con solución reguladora de pH.
Balanza analítica, Sartorius Basic, BA 210S	1 unidad	Balanza analítica debidamente calibrada y certificada
Mufla Furnace, modelo LEF-P Type	1 unidad	Gradúe la temperatura y el tiempo a los valores necesarios según el requerimiento

Anexo 2. Inventario de reactivos y materiales

REACTIVO	FORMULA
Agua tipo HPLC	H ₂ O
Ácido Sulfúrico concentrado	H ₂ SO ₄
Ácido Nítrico concentrado	HNO ₃
Ácido Clorhídrico concentrado	HCl
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃
Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂
Ácido Fosfórico	H ₃ PO ₄
Hidróxido de Sodio	NaOH
Cloruro de Sodio	NaCl
Estándar de cadmio (Cd) 1000 ppm	
MATERIAL	CANTIDAD
Espátula	1
Pera de succión	1
Agitador de vidrio	1
Vaso de precipitado de 250mL	2
Vaso de precipitado de 50mL	6
Balón aforado de 25mL	2
Pipeta aforada de 10mL	3
Pipeta aforada de 5mL	2
Pipeta aforada de 1mL	3
Crisol	12
Embudo de vidrio	6

Anexo 3. Análisis estadístico anova de un factor para muestra A

Análisis descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
vítreo	3	216,00	41,677	24,062	112,47	319,53	168	243
mercurio	3	1414,33	231,364	133,578	839,59	1989,07	1151	1585
absorción	3	1624,33	67,929	39,219	1455,59	1793,08	1546	1667
Total	9	1084,89	669,260	223,087	570,45	1599,33	168	1667

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3463505,556	2	1731752,778	86,760	,000
Intra-grupos	119761,333	6	19960,222		
Total	3583266,889	8			

Comparaciones múltiples

(I) técnica usada (J) técnica usada		Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
					Límite inferior	Límite superior	
HSD de Tukey	Vítreo	Mercurio	-1198,333*	115,355	,000	-1552,27	-844,39
		Absorción	-1408,333*	115,355	,000	-1762,27	-1054,39
	Mercurio	Vítreo	1198,333*	115,355	,000	844,39	1552,27
		Absorción	-210,000	115,355	,242	-563,94	143,94
	Absorción	Vítreo	1408,333*	115,355	,000	1054,39	1762,27
		Mercurio	210,000	115,355	,242	-143,94	563,94

técnica usada		N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD de Tukey ^a	Vítreo	3	216,00	
	Mercurio	3		1414,33
	Absorción	3		1624,33
	Sig.		1,000	,242
Duncan ^a	vítreo	3	216,00	
	mercurio	3		1414,33
	absorción	3		1624,33
	Sig.		1,000	,119

Anexo 4. Análisis estadístico anova de un factor para muestra B

Análisis descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Vítreo	3	153,67	6,658	3,844	137,13	170,21	148	161
mercurio	3	2729,67	222,505	128,463	2176,93	3282,40	2473	2868
absorción	3	2771,33	35,233	20,342	2683,81	2858,86	2732	2800
Total	9	1884,89	1303,422	434,474	882,99	2886,79	148	2868

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	13489690,889	2	6744845,444	398,365	,000
Intra-grupos	101588,000	6	16931,333		
Total	13591278,889	8			

Comparaciones múltiples

(I) método (J) método		Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
					Límite inferior	Límite superior	
HSD de Tukey	Vítreo	Mercurio	-2576,000*	106,243	,000	-2901,98	-2250,02
		Absorción	-2617,667*	106,243	,000	-2943,65	-2291,68
	Mercurio	Vítreo	2576,000*	106,243	,000	2250,02	2901,98
		Absorción	-41,667	106,243	,920	-367,65	284,32
	Absorción	Vítreo	2617,667*	106,243	,000	2291,68	2943,65
		Mercurio	41,667	106,243	,920	-284,32	367,65

Método	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
HSD de Tukey ^a	Vítreo	3	153,67
	mercurio	3	2729,67
	absorción	3	2771,33
	Sig.	1,000	,920
Duncan ^a	Vítreo	3	153,67
	mercurio	3	2729,67
	Absorción	3	2771,33
	Sig.	1,000	,708

Anexo 5. Tablas de resultados de validación de métodos

A. Resultados Para Voltamperometría Con Electrodo De Carbón Vítreo

Resultados para estándar bajo (400 ppb)

Estándar 400 ppb	Analista 1		Analista 2	
	IP	concentraciones (ppb)	IP	concentraciones (ppb)
1	3,76E-07	538	3,76E-07	538
2	5,37E-07	619	5,06E-07	603
3	5,91E-07	645	3,78E-07	539
4	6,45E-07	672	8,78E-07	789
5	6,22E-07	661	4,26E-07	563
6	6,45E-07	672	6,46E-07	673

Resultados para estándar alto (900 ppb)

estándar 900 ppb	Analista 1		Analista 2	
	IP	concentraciones (ppb)	IP	concentraciones (ppb)
1	2,09E-06	1393	3,03E-06	1866
2	2,12E-06	1412	2,14E-06	1422
3	2,21E-06	1454	2,69E-06	1693
4	2,25E-06	1475	3,00E-06	1852
5	2,41E-06	1554	2,72E-06	1710
6	2,09E-06	1397	1,40E-06	1049

Resultados para muestra con adiconado de estándar bajo (400 ppb)

muestra + estándar bajo(400 ppb)	Analista 1		Analista 2	
	IP	concentraciones (ppb)	IP	concentraciones (ppb)
A	3,55E-07	528	3,66E-07	533
	3,24E-07	512	3,75E-07	538
	3,02E-07	501	2,84E-07	492
B	6,03E-07	652	2,33E-07	466
	5,72E-07	636	4,05E-07	552
	5,37E-07	619	2,78E-07	489

Resultados para muestra con adiconado de estándar alto (900 ppb)

muestra + estándar alto(900 ppb)	Analista 1		Analista 2	
	IP	concentraciones (ppb)	IP	concentraciones (ppb)
A	5,59E-07	1886	2,34E-06	1521
	3,77E-07	1659	2,06E-06	1381
	5,02E-07	1534	2,91E-06	1806
B	5,37E-07	618	3,07E-06	629
	4,58E-07	579	2,62E-06	539
	3,62E-07	531	2,37E-06	601

B. Resultados Para Voltamperometría Con Electrodo De Mercurio O Polarografía

Resultados para estándar bajo (15 ppb)

Estándar 15 ppb	Analista 1		Analista 2	
	IP	concentraciones (ppb)	IP	concentraciones (ppb)
1	8,45E-09	15	8,62E-09	15
2	8,91E-09	16	8,44E-09	15
3	8,72E-09	16	8,80E-09	16
4	8,32E-09	14	8,77E-09	16
5	8,98E-09	17	7,79E-09	13
6	8,72E-09	16	8,93E-09	16

Resultados para estándar alto (150 ppb)

Estándar 150 ppb	Analista 1		Analista 2	
	IP	concentraciones (ppb)	IP	concentraciones (ppb)
1	4,51E-08	137	4,58E-08	139
2	4,62E-08	141	4,57E-08	139
3	4,56E-08	139	4,54E-08	138
4	5,00E-08	153	4,56E-08	139
5	4,57E-08	139	4,64E-08	141
6	4,69E-08	143	4,70E-08	143

Resultados para muestra

muestra A	Analista 1		Analista 2	
	IP	concentraciones (ppb)	IP	concentraciones (ppb)
1	6,80E-09	9	6,37E-09	8
2	6,34E-09	8	6,50E-09	8
3	7,43E-09	11	5,95E-09	7
4	6,90E-09	10	6,51E-09	8
5	7,02E-09	10	5,80E-09	6
6	5,88E-09	6	5,90E-09	6
7	6,03E-09	7	6,75E-09	9
muestra B	Analista 1		Analista 2	
	IP	concentraciones (ppb)	IP	concentraciones (ppb)
1	1,42E-08	34	1,33E-08	31
2	1,14E-08	25	1,31E-08	30
3	1,15E-08	25	1,09E-08	23
4	1,37E-08	32	1,21E-08	27
5	1,44E-08	35	1,19E-08	26
6	1,36E-08	32	1,19E-08	26
7	1,37E-08	32	1,09E-08	23

Resultados muestra con adicionado

muestra A + adicionado 15 ppb	Analista 1		Analista 2	
	IP	concentraciones (ppb)	IP	concentraciones (ppb)
1	2,05E-08	55	1,54E-08	38
2	1,59E-08	40	1,56E-08	39
3	1,89E-08	50	1,59E-08	40
4	1,75E-08	45	1,65E-08	42
5	1,67E-08	42	1,75E-08	45
6	1,84E-08	48	1,81E-08	47
muestra B + adicionado 150 ppb	Analista 1		Analista 2	
	IP	concentraciones (ppb)	IP	concentraciones (ppb)
1	5,141E-08	158	4,788E-08	146
2	5,429E-08	168	5,136E-08	158
3	4,908E-08	150	4,980E-08	153
4	4,859E-08	149	4,978E-08	153
5	5,052E-08	155	5,110E-08	157
6	5,450E-08	168	4,714E-08	144